

## LISTE DES ABBREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADP** : Adénine diphosphate

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATCC**: American type culture collection

**BLSE** : Bêta-lactamase à spectre étendu

**C**: Concentration

**CARB** : Carbapénémase

**Case** : Céphalosporinase

**CA-SFM** : Commission de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

**CAZ** : Ceftazidimase

**CHNU** : Centre hospitalier national universitaire

**Chr** : Chromosomique

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**CMY-1** : Céphamycinase 1

**CMY-2** : Céphamycinase 2

**CSP III** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

**°C** : Degrés Celsius

**D**: Diamètre critique

**H2S** : Hydrogène disulfuré

**I** : Intermédiaire

**IQR** : Interquartile Range

**L** : Litre

**LCR** : Liquide céphalo-rachidien

**LPS** : Lipopolysaccharide

**méti-S** : Sensible à la méticilline

**méti-R** : Résistante à la méticilline

**mg** : Milligramme

**MH** : Müller Hinton

**MI** : Médecine interne

**ml** : Millilitre

**mm** : Millimètre

**µm** : Micromètre

**NCCLS** : National committee on clinical laboratory standards

**ONPG** : Ortho nitro-phényl beta-galactosidase

**OpmF**: Outer-Membrane Porin

**OXA** : Oxacillinase

**P** : Pearson chi-Square

**Pase** : Pénicillinase

**PBP** : Protein binding penicillin

**PCMB** : Para-chloro-mercury-benzoate

**Péni G** : Pénicilline G

**Péni A** : Pénicilline A

**Péni M** : Pénicilline M

**Ph.alanine DA** : Phényl alanine désaminase

**Pl** : Plasmidique

**PLP** : Protéine de liaison à la pénicilline

**R** : Résistant

**R** : Rough

**S** : Smooth

**S** : Sensible

**SHV** : Sulfhydryl variable

**7 A.C.A** : Acide 7-amino-céphalosporanique

**6 A.P.A** : Acide 6-amino-pénicillanique

**TDA** : Tryptophane désaminase

**TEM** : Temoneira

**TRI** : TEM Resistant inhibitor

**UFC** : Unité formant colonies

**USI** : Unité de soins intensifs

**V.P** : Voges Proskauer

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Structure du cycle $\beta$ -lactame et des dérivés aminés des $\beta$ -lactamines..	<b>15</b>
<b>Figure 2.</b> Structure des différentes $\beta$ -lactamines.....	<b>16</b>
<b>Figure 3.</b> Mécanisme de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	<b>29</b>
<b>Figure 4.</b> Classification des $\beta$ -lactamases .....	<b>37</b>
<b>Figure 5.</b> Organigramme du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec (Juillet 2011).....	<b>49</b>
<b>Photo A.</b> Mise en évidence des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	<b>56</b>
<b>Figure 6.</b> Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE entre 2011 et 2013.....	<b>58</b>
<b>Figure 7.</b> Prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du sexe.....	<b>59</b>
<b>Figure 8.</b> Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'origine.....	<b>60</b>
<b>Figure 9.</b> Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE entre 2011 et 2013.....	<b>61</b>
<b>Figure 10.</b> Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil.....	<b>62</b>
<b>Figure 11.</b> Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil.....	<b>63</b>
<b>Figure 12.</b> Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique.....	<b>63</b>

<b>Figure 13.</b> Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique.....	<b>64</b>
<b>Figure 14.</b> Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du germe.....	<b>65</b>
<b>Figure 15.</b> Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du germe.....	<b>66</b>
<b>Figure 16.</b> Evolution de la résistance des entérobactéries sécrétrices de BLSE entre 2011 et 2013.....	<b>69</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b> Composition et caractères différentiels des tribus des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	<b>5</b>
<b>Tableau II.</b> Caractères biochimiques de quelques entérobactéries.....	<b>12</b>
<b>Tableau III.</b> Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux β-lactamines... <b>30</b>	
<b>Tableau IV.</b> Classification de Richmond et Sykes des β-lactamases des bactéries à Gram négatif.....	<b>33</b>
<b>Tableau V.</b> Classification déjà connue des β-lactamases à large spectre modifiée par Payne et Amyes.....	<b>38</b>
<b>Tableau VI.</b> Mécanismes de résistance non enzymatique aux β-lactamines chez les bactéries à Gram négatifs.....	<b>40</b>
<b>Tableau VII.</b> Cassettes de résistance aux antibiotiques décrites sur des intégrons.....	<b>44</b>
<b>Tableau VIII.</b> Pourcentage de résistance des entérobactéries sécrétrices de BLSE aux antibiotiques.....	<b>67</b>

# SOMMAIRE

## Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Première partie : Rappels bibliographiques.....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre I : Généralités sur les Entérobactéries.....</b>	<b>3</b>
I.1. Définition.....	3
I.2. Classification.....	3
I.3. Habitat et pouvoir pathogène.....	8
I.4. Caractères culturaux.....	9
I.5. Caractères antigéniques.....	9
I.6. Caractères biochimiques.....	10
<b>Chapitre II : Généralités sur les β-lactamines.....</b>	<b>14</b>
II.1. Définition.....	14
II.2. Caractéristiques des β-lactamines.....	14
II.3. Classification des β-lactamines.....	18
<b>Chapitre III : Resistance bactérienne.....</b>	<b>24</b>
III.1. Définition de la résistance bactérienne.....	24
III.2. Les différents types de résistance.....	24
III.3. Support génétique de la résistance.....	25
III.4. Mécanisme de résistance aux β-lactamines.....	28
<b>Deuxième partie : Méthodologie-Résultats-Discussion-Recommandations....</b>	<b>45</b>
<b>Chapitre I : Cadre d'étude.....</b>	<b>45</b>
I.1. Le CHNU A. Le Dantec.....	45
I.2. Le laboratoire de Bactériologie-Virologie.....	45

<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>50</b>
II.1. Souches bactériennes.....	50
II.1.1. Souches à tester.....	50
II.1.2. Souches de référence.....	50
II.2. Méthodes d'isolement à partir des produits pathologiques.....	50
II.3. Identification des entérobactéries.....	51
II.4. L'antibiogramme.....	52
II.4.1. Matériel et réactifs.....	52
II.4.2. Principe de l'antibiogramme.....	52
II.4.3. Technique de diffusion en gélose : méthode des disques.....	53
II.5. Détection des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) par la méthode de diffusion par double disque.....	55
II.6. Analyse des données.....	57
<b>Chapitre III : Résultats.....</b>	<b>58</b>
III.1. Prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE.....	58
III.2. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'âge.....	59
III.3. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du sexe...59	59
III.4. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'origine.....	60

III.5. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil ou d'hospitalisation.....	61
III.6. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique.....	63
III.7. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du germe.....	64
III.8. Profil de sensibilité des souches sécrétrices de BLSE.....	66
<b>Chapitre IV : Discussion.....</b>	<b>70</b>
IV.1. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE.....	70
IV.2. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'espèce.....	71
IV.3. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'origine.....	72
IV.4. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil.....	73
IV.5. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique.....	74
IV.6. Profil de sensibilité des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE.....	74

<b>Chapitre V : Recommandations.....</b>	<b>78</b>
V.1. Prise en charge des infections nosocomiales.....	78
V.2. Le bon usage des antibiotiques.....	79
<b>Conclusion.....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>84</b>

## Introduction

Au cours de ces dix dernières années, les bactéries à Gram négatif multirésistantes sont devenues un problème majeur de santé publique. Depuis les années 2000, nous assistons en Afrique et dans le monde à une augmentation constante de la prévalence des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (CSP III) et aux monobactams. Les entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) contribuent fortement à l'émergence de la résistance [49]. Ces enzymes, décrites pour la première fois en 1983 en Allemagne à partir de souches de *Klebsiella pneumoniae* et de *Serratia marcescens* [54], ont été rapportées à travers le monde et s'étendent à différentes espèces d'entérobactéries [7].

Les BLSE sont des enzymes transférables à médiation plasmidique qui inactivent les oxyimino-β-lactamines (céfotaxime, ceftazidime, aztréonam) [36, 19, 31, 74]. Les infections nosocomiales, causées par les entérobactéries pourvues de ces enzymes, posent un véritable problème thérapeutique du fait de la résistance et du choix limité des molécules d'antibiotiques disponibles sur le marché [53].

Les entérobactéries sécrétrices de BLSE ont été associées à l'expansion des infections nosocomiales conduisant à une hospitalisation prolongée, une augmentation de la morbidité et de la mortalité et par conséquent à des coûts élevés de prise en charge sanitaire [56, 67].

A notre connaissance, peu de données permettent de définir l'ampleur de ce phénomène au Sénégal, tant au niveau hospitalier que communautaire. C'est dans ce contexte que cette étude rétrospective sur l'épidémiologie des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE isolées au laboratoire de Bactériologie du CHNU A. Le Dantec a été effectuée entre 2011 et 2013.

Ainsi, cette étude aura comme objectifs :

- de déterminer les prévalences de ces entérobactéries sécrétrices de BLSE au cours de ces trois dernières années ;
- d'évaluer leur distribution en fonction de l'âge, du sexe, des produits pathologiques, des services d'accueil ou d'hospitalisation ;
- d'établir leur profil de sensibilité par rapport à diverses familles d'antibiotiques.

La première partie de notre travail sera consacrée à des rappels relatifs aux entérobactéries, aux  $\beta$ -lactamines et la résistance bactérienne.

La seconde partie abordera la méthodologie utilisée et la discussion des résultats obtenus avant de conclure par des recommandations.

# Première partie : Rappels bibliographiques

## Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries

### I.1. Définition [4]

La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de caractères bactériologiques communs :

- ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 2 à 3µm de long sur 0,6µm de large ;
- immobiles ou mobiles par une ciliature péritricte ;
- se développent en aéro-anaérobiose ;
- facilement cultivables ;
- acidifient le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz ;
- réduisent les nitrates en nitrites ;
- dépourvues de cytochrome oxydase.

Le nom d'entérobactéries avait été donné à cette famille car la majorité des membres qui la composent sont des hôtes du tube digestif, mais il existe d'autres localisations dont le sol, les végétaux.

### I.2. Classification

Une centaine d'espèce d'*Enterobacteriaceae* sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 90% des souches isolées en clinique [4].

Dans le “Bergey's manual of determinative bacteriology”, les entérobactéries sont classées en 5 (cinq) tribus :

- Tribu I : *Escherichiae*,
- Tribu II : *Klebsiellae*,
- Tribu III : *Proteae*,
- Tribu IV : *Yersiniae*,

- Tribu V : *Erwiniae* (découverte récente).

Ces tribus des *Enterobacteriaceae* sont classées selon leur composition et leurs caractères différentiels (Tableau I) [35].

Rapport-Gratuit.com

**Tableau I.** Composition et caractères différentiels des tribus des *Enterobacteriaceae* [35].

	<i>Escherichiae</i>	<i>Klebsiellae</i>	<i>Proteae</i>	<i>Yersiniae</i>
Genres faisant partie de la tribu	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i> <i>Salmonella</i> <i>Citrobacter</i> ( <i>Levinea</i> *) <i>Edwarsiella</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> ( <i>Hafnia</i> *) <i>Serratia</i>	<i>Proteus</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Nouveau genre rattaché	<i>Kluyvera</i>	<i>Cedecea</i>	<i>Tatumella</i>	
TDA	-	-	+	-
Uréase	-	d	d	+ (c)
Voges Proskauer à 37°C 22°C	-	dd	-(b) d	- d
Mobilité à 37°C	D	d	+(b)	+ à 22°C
Sensibilité à la colistine	+(a)	d	-(b)	d
	a = sauf <i>Edwarsiella</i>		b = sauf <i>Tatumella</i>	c = sauf <i>Y. ruckeri</i>
<p>d= différent suivant les genres ou les espèces</p> <p>* = synonymes</p>				

Ces différentes tribus peuvent être subdivisées en genres ou en sous-genres, en espèces, en sérogroupes, en sérotypes.

### **I.2.1. La tribu des *Escherichiae***

Cette tribu comprend cinq genres principaux, à savoir les genres *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter* et *Edwardsiella*.

Le genre *Kluyvera* qui possède les caractères biochimiques de définition de cette tribu y est rattaché.

#### **I.2.1.1. Le genre *Escherichia***

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce *E. coli* intéressante en bactériologie médicale et qui est l'espèce la plus fréquemment isolée au laboratoire de bactériologie.

#### **I.2.1.2. Le genre *Shigella***

Ce genre comprend quatre espèces correspondant à 4 sérogroupes A, B, C, D pouvant comporter un ou plusieurs sérotypes : groupe A = *S. dysenteriae* avec dix sérotypes ; groupe B = *S. flexneri* avec six sérotypes ; groupe C = *S. boydii* avec quinze sérotypes et groupe D = *S. sonnei* avec un seul sérotypes.

#### **I.2.1.3. Le genre *Salmonella***

Il s'agit d'un très vaste groupe bactérien comportant plus de 2000 espèces. Ce genre est divisé en cinq sous-genres, le sous-genre 1 étant celui isolé le plus souvent chez l'homme, les autres étant retrouvés chez les animaux à sang froid. Du point de vue médical, il convient de distinguer deux grands groupes chez les salmonelles : les salmonelles majeures, agents de la fièvre typhoïde et des fièvres paratyphoïdes (*S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*) et

tous les sérotypes « mineurs» responsables d'intoxications alimentaires, de gastro-entérites ou d'infection septicémique de type opportuniste.

#### **I.2.1.4. Le genre *Citrobacter***

Ce genre est composé de trois espèces : *C. freundii*, *C. amalonaticus*, *C. diversus*.

#### **I.2.1.5. Le genre *Edwarsiella***

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce en bactériologie médicale : *E. tarda*.

#### **I.2.1.6. Le genre *Kluyvera***

Il s'agit d'un genre de création récente. Il existerait au moins trois espèces dont deux ont actuellement une dénomination précise : *K. ascorbata* et *K. crycrescens*.

### **I.2.2. La tribu des *Klebsiellae***

Cette tribu comporte trois genres : *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*.

#### **I.2.2.1. Le genre *Klebsiella***

Ce genre est composé de sept espèces selon la classification de David A. Bruckner et Paul Colonna en 1995 dont : *K. ornithinolytica* synonyme de *K. oxytoca* ornithine positive, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. planticola*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* et *K. terrigena*.

#### **I.2.2.2. Le genre *Enterobacter***

Il est composé de six espèces : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*.

### I.2.2.3. Le genre *Serratia*

Il est composé de cinq espèces : *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidea*, *S. plymuthica*, *S. odorifera*.

### I.2.3. La tribu des *Proteae*

Elle comporte actuellement trois genres regroupant six espèces :

- ***Proteus*** : *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. alcalifaciens*.
- ***Providencia***: *P. stuartii*, *P. rettgeri*.
- ***Morganella*** : *M. morganii*.

### I.2.4. La tribu des *Yersiniae*

Elle comporte sept espèces : *Y. pestis*, *Y. ruckerii*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. fredericksenii*, *Y. kristensenii*.

## I.3. Habitat et pouvoir pathogène [4, 35].

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* sont pour la plupart des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Ces bactéries représentent la majorité de la flore intestinale aéro-anaérobie. Chez l'homme, l'entérobactérie prédominante est *E. coli*. Parmi les nombreuses espèces d'entérobactéries, certaines sont trouvées dans l'environnement, d'autres chez les végétaux. Il en est qui ont un pouvoir phytopathogène.

Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certaines (*Shigella*) sont constamment pathogènes. D'autres espèces se comportent comme des pathogènes opportunistes responsables d'infection chez les malades fragilisés (*Klebsiella*). Leur identification constitue une part importante du travail du laboratoire de bactériologie.

#### I.4. Caractères culturaux [4]

Les *Enterobacteriaceae* se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose incubés 18h à 37°C. Sur gélose, on peut obtenir différentes formes :

- Les formes S “smooth” sont l’aspect habituel au sortir de l’organisme. Les colonies sont lisses, brillantes, bombées et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre.
- Les formes R “rough” s’observent surtout avec les souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.

En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10mm, elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d’autres espèces, notamment *S. paratyphi B*.

Les colonies naines s’observent avec les souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez *E. coli* isolé d’infections urinaires.

#### I.5. Caractères antigéniques [4]

L’identification des *Enterobacteriaceae* se fait par l’étude des caractères biochimiques. La détermination du sérotype ne peut être entreprise que pour des souches dont l’identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu’entraîner des erreurs du fait d’agglutinations croisées non spécifiques.

- Les antigènes O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistant à l’alcool ou à l’acide.

Les réactions d’agglutination se produisent lentement et sont constituées d’agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

- Les antigènes H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermostables et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutination se produisent rapidement et sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

- Les antigènes K

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B d'*E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérum O. Ils sont détruits par une ébullition de 2 heures.

Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

- L'antigène Kunin

Cet antigène commun des *Enterobacteriaceae* n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique.

Des antisérum dirigés spécifiquement contre chacun des antigènes bactériens sont préparés en utilisant les méthodes de l'absorption spécifique des anticorps de Castelcani. Des anticorps qui se sont fixés sur l'antigène bactérien correspondant forment des agglutinats. Après centrifugation, il ne reste plus dans le surnageant que des anticorps qui n'ont pas été en contact avec l'antigène.

## **I.6. Caractères biochimiques [35].**

Il faut d'emblée souligner que l'identification des *Enterobacteriaceae* est d'abord basée sur des caractères biochimiques complétés, pour certains genres

par la sérotypie. Celle-ci n'a de sens qu'une fois le genre ou l'espèce déterminée car les communautés antigéniques inter-genre et inter-espèce sont nombreuses (Tableau II).

**Tableau II.** Caractères biochimiques de quelques entérobactéries [35].

	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. diversus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Morganella</i>	<i>P. rettgeri</i>	Providencia	<i>Yersinia</i>	
Mobilité	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Gaz en glucose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-
Lactose	-	+/ $\times$	+	+/ $\times$	-/+	+	+/ $\times$	-	-	-	-	-	-	-	-
Test ONPG	-	+	+	+	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
H2S	+ (-)	+ (-)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Uréase	-	- (+)	-	-	-	+/-	-	-	+	+	+	+	+	-	+/-
Ph.alanine DA et TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Indole	-	-	+	+	+/-	- (+)	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Citrate de Simmons	+ (-)	+	+	-	-	+/-	+	+	+/-	+/-	-	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	-	-	+	+/-	+/-	
Saccharose	-	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	$\times$	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
V.P	-	-	-	-	-	+ (-)	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ = positif en 1 ou 2 jours ; (+) = positif tardivement ; - = négatif ; **DA** = désaminase ; **TDA** = tryptophane désaminase ; **V.P** = Voges Proskauer ;  $\times$  = tardivement et irrégulièrement positif (fermentation due à des mutants) ; -(+) = en général négatif – exceptionnellement positif tard

## Chapitre II : Généralités sur les $\beta$ -lactamines

### II.1. Définition

Les  $\beta$ -lactamines constituent la plus vaste et la plus prolifique famille d'antibiotiques utilisés en thérapeutique. Certains produits naturels sont obtenus par fermentation de microorganismes des genres *Penicillium* (Pénicillines) et *Cephalosporium acremonium* (Céphalosporines) mais aussi de nombreux dérivés hémisynthétiques ont été mis au point. Ces dernières années, la famille des  $\beta$ -lactamines s'est enrichi de nombreuses molécules particulièrement dans le groupe des céphalosporines. Cette croissance exponentielle constitue, avec la structure spéciale des molécules de  $\beta$ -lactamines, une des caractéristiques de ces antibiotiques.

### II.2. Caractéristiques des $\beta$ -lactamines

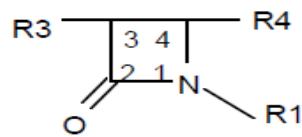
Les  $\beta$ -lactamines sont caractérisées par leur structure et leur mécanisme d'action.

#### II.2.1. Structure (figures 1 et 2)

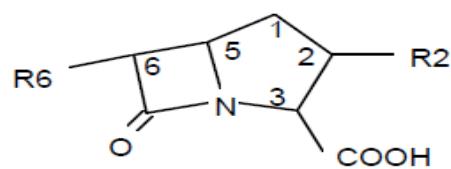
Les  $\beta$ -lactamines ont en commun le cycle  $\beta$ -lactame, support de l'activité antibactérienne dont l'ouverture conduit à des produits inactifs.

Les molécules de  $\beta$ -lactamines diffèrent, dans le cas des dérivés classiques, par la chaîne latérale substituant : l'acide 6-amino-pénicillanique (6 A.P.A.) dans le cas des pénicillines et l'acide 7-amino-céphalosporanique (7 A.C.A.) pour les céphalosporines [66].

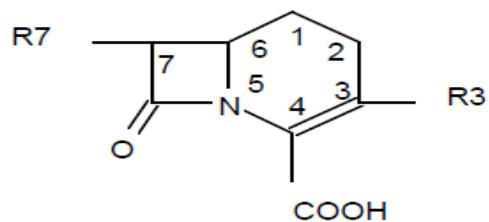
Il existe des dérivés dits « non classiques » ayant un noyau central modifié mais possédant une structure apparentée.



Cycle  $\beta$ -lactame

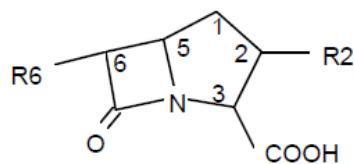


Acide 6-aminopénicillanique ( 6 A.P.A.)

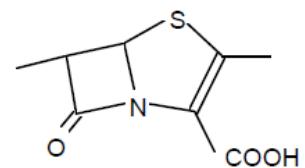


Acide 7-aminocéphalosporanique (7 A.C.A.)

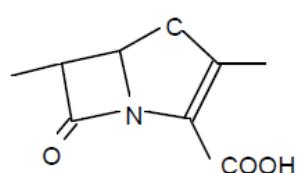
**Figure 1.** Structures du cycle  $\beta$ -lactame et des dérivés aminés des  $\beta$ -lactamines [66].



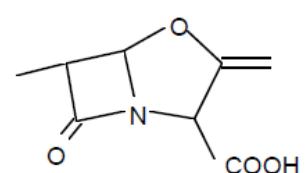
pénams



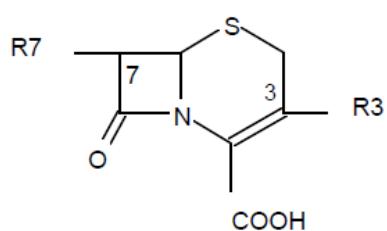
pénems.



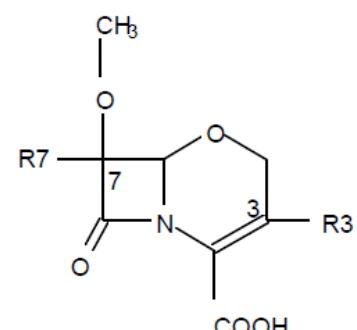
carbapénems.



oxapénams.



céphems.



oxacéphems.

**Figure 2.** Structures des différentes  $\beta$ -lactamines [66].

## II.2.2. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines appartiennent au groupe des antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne. Toutes les  $\beta$ -lactamines ont le même mécanisme d'action : elles agissent sur la synthèse du peptidoglycane ou muréine, constituant de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif en inhibant la transpeptidase qui joue le rôle de régulateur dans la synthèse de celle-ci [28].

L'action des  $\beta$ -lactamines est liée à la structure de la paroi bactérienne.

En règle générale, la paroi des bactéries à Gram positif se laisse pénétrer sans difficulté par les  $\beta$ -lactamines, car le peptidoglycane ne s'oppose pas au passage des molécules d'aussi petite taille. Cette règle ne s'applique pas aux bactéries à Gram négatif à cause de la structure particulière de la paroi de ces bactéries qui ne laissent passer les  $\beta$ -lactamines qu'à travers les porines. Les porines sont des protéines transmembranaires ayant la faculté de se regrouper pour former des canaux, des pores remplis d'eau, permettant ainsi la diffusion à travers la membrane de différents solutés hydrophiles.

Différents facteurs physico-chimiques peuvent influencer la pénétration des  $\beta$ -lactamines à travers la paroi bactérienne :

- L'hydrophobicité de la molécule ;
- La taille de la molécule ;
- La charge : les composés zwittérioniques (à double charge, négative et positive : céfémide et imipénème) diffusent beaucoup plus rapidement à travers les porines que les composés ayant une charge unique : céfaloïne, céfuroxime, céfotaxime, ureïdopénicillines. Une charge négative nette (soit une charge négative unique soit deux charges négatives et une charge positive) ralentit plus fortement la diffusion à travers la porine (OpmF).

Cependant, les propriétés énoncées ci-dessus n'ont qu'une faible incidence sur la diffusion des  $\beta$ -lactamines à travers les porines de *Pseudomonas aeruginosa* [28].

### II.3. Classification des $\beta$ -lactamines [21, 65]

La famille des  $\beta$ -lactamines se compose de quatre groupes de molécules : les pénames, les pénèmes, les céphèmes et les monobactames. On doit ajouter les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases dont certains sont inclus dans ces quatre groupes. La structure de base des  $\beta$ -lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame, indispensable à l'activité des molécules. Sur cette structure, est fixé un cycle penta-atomique saturé (péname), insaturé (pénème) ou hexa-atomique (céphèmes).

Le noyau azétidinone seul peut être substitué ; en fonction des substituants de l'atome d'azote, on distingue : les monophosphatames et d'autres hétérocycles. Actuellement, du fait de la complexité de ce groupe, il est dénommé monolactame.

Les **pénames** composés par :

- Les pénicillines :
  - Péni G (pénicilline G, extencilline)
  - Péni A (ampicilline, amoxicilline)
  - Péni M (oxacilline, méticilline) : résiste à la pénicillinase des staphylocoques
  - Carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline)
  - Ureïdopénicillines (pipéracilline, mezlocilline)
  - Amidinopénicillines (pivmécillinam, mécillinam)
  - Les Méthoxy-pénames (témocilline)
  - Les Oxapénames (acide clavulanique)
  - Les Carbapénames.

Les **pénèmes** composés par :

- Les carbapénèmes : imipénème, méropénème
- Sulfopénèmes

- Oxapénèmes

Les **céphèmes** comprenant :

- Les céphalosporines avec quatre générations :
  - 1<sup>ère</sup> génération : céfalotine, céfazoline
  - 2<sup>ème</sup> génération : céfuroxime, céfamandole
  - 3<sup>ème</sup> génération : céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime
  - 4<sup>ème</sup> génération : céfémipe, cefpirome
- Les oxacéphèmes : lamoxactam
- Les céphamycines : céfotétan
- Les carbacéphèmes

Les **monobactames** comprenant :

- Les monobactames : aztréonam
- Les nocardicines
- Les monophosphames
- Les monocarbames
- Les monosulfactames

### II.3.1. Les pénicillines (pénames) [63]

Elles possèdent un cycle thiazolidine accolé au noyau  $\beta$ -lactame. Elles diffèrent par la nature de leur chaîne latérale.

- Pénicilline G

C'est la première pénicilline découverte par Fleming. Elle est produite par *Penicillium notatum*. Elle est active sur les cocci (à exception des staphylocoques dont la grande majorité produit maintenant une pénicillinase), la plupart des bacilles à Gram positif, les anaérobies.

- Pénicilline M

La méticilline fut le premier dérivé de la pénicilline capable de résister à la pénicillinase du staphylocoque. On peut citer également l'oxacilline et la cloxacilline. Ces produits ne sont indiqués que pour le traitement des infections à staphylocoques sensibles à la méticilline (méti-S), car ils sont souvent moins actifs que la pénicilline G sur les autres bactéries. Le pourcentage de staphylocoques résistants à la méticilline (méti-R) est important en milieu hospitalier.

- Aminopénicillines (pénicillines A)

Leur spectre d'activité est élargi, par rapport à la pénicilline G, vers certains bacilles à Gram négatif (*H. influenzae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*), mais elles restent sensibles aux  $\beta$ -lactamases souvent présentes chez ces bactéries. Dans ce groupe, on peut citer l'ampicilline et l'amoxicilline.

- Carboxypénicillines

Elles ont un spectre plus étendu que celui des aminopénicillines, vers les bacilles à Gram négatif. Elles peuvent en particulier agir sur *P. aeruginosa*. Elles restent sensibles aux pénicillinases, mais sont moins sensibles aux céphalosporinases. La première molécule de ce type fut la carbénicilline, remplacée maintenant par la ticarcilline. On l'utilise surtout pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*.

- Ureïdopénicillines

Elles comprennent principalement la mezlocilline et la pipéracilline. Leur spectre est assez proche de celui des carboxypénicillines. La pipéracilline a une bonne activité sur *P. aeruginosa*. Les ureïdopénicillines conservent une bonne activité sur les entérocoques.

- Amidinopénicillines

Elles comprennent le mécillinam et le pivmécillinam. Ces produits sont actifs sur certaines entérobactéries et ne sont utilisés que dans les infections urinaires.

- Inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases

Des molécules ayant une structure de pénicilline (mais dépourvues d'activité antibiotique significative) ont la propriété de se lier à certaines  $\beta$ -lactamases (surtout plasmatiques) et de les inhiber de manière irréversible. Leur association à des pénicillines permet de restaurer l'activité de ces dernières vis-à-vis de bactéries produisant ces  $\beta$ -lactamases (*S. aureus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis* et diverses entérobactéries). Les inhibiteurs commercialisés sont : l'acide clavulanique (associé à l'amoxicilline ou la ticarcilline), le sulbactam (seul ou associé à l'ampicilline), le tazobactam (associé à la pipéracilline).

### **II.3.2. Les pénèmes**

- Carbapénèmes

Dans ce groupe, seul l'imipénème est commercialisé en France. C'est un dérivé de la thiénamycine. Il est associé à la cilastatine pour prévenir sa dégradation au niveau du rein. L'imipénème est très actif sur un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. L'imipénème est résistant à la plupart des  $\beta$ -lactamases, y compris les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi. Des résistances acquises sont apparues chez *P.aeruginosa*. De très rares souches d'entérobactéries et d'*Acinetobacter* capables de dégrader l'imipénème ont été décrites.

### **II.3.3. Céphalosporines (céphèmes)**

Les céphalosporines sont constituées d'un noyau  $\beta$ -lactame associé à un noyau de dihydrothiazine. Elles résistent à la pénicillinase des staphylocoques comme les pénicillines M, mais sont inactives sur les souches mét-R. Elles peuvent agir sur les bacilles à Gram négatif à des degrés divers.

Les céphalosporines peuvent être classées de plusieurs manières :

- Classification de Wise ;
- Classification d'O'Callaghan ;
- Classification en générations.

Cette dernière classification est la plus courante. Une classification qui était basée sur la CMI.

Ainsi, on distingue :

Les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (comme la céfalotine) ont un niveau d'activité assez limité vis-à-vis des bacilles à Gram négatif, en raison de leur sensibilité aux céphalosporinases. Elles sont caractérisées par une CMI relativement basse (1 - 10 mg/l de sang).

Les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et surtout de 3<sup>ème</sup> génération sont beaucoup plus actives. Parmi les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération, on peut citer la céfamandole et la céfuroxime ainsi que deux molécules classées parmi les céphamycines : la céfoxidine et le céfotétan. Ces deux dernières ont une bonne activité sur *B. fragilis* et sont résistantes aux  $\beta$ -lactamases à spectre élargi. Le céfotétan est classé par certains parmi les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Leur CMI est plus basse que celle des céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (0,25 mg - 4 mg/l de sang).

Parmi les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, on peut citer le céfotaxime, la ceftazidime et la ceftriaxone. Ces molécules sont, comme les pénicillines, très actives sur les *Neisseria*, les streptocoques et les pneumocoques, *S. aureus* que les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération. Leur résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamases leur permet d'être très actives sur de nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif (notamment *H. influenzae* et la plupart des entérobactéries). Vis-à-vis de *P. aeruginosa*, la ceftazidime est la seule active, avec la cefsulodine (céphalosporine qui n'est utilisée que dans cette indication). Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération sont peu actives sur *Acinetobacter*, inactives sur *Stenotrophomonas* et sur les bactéries hyperproductrices de céphalosporinases

(céphalosporinases déréprimées, observées notamment chez *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *P.aeruginosa*). Elles sont caractérisées par une CMI encore plus basse que celle des céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et de 1<sup>ère</sup> génération. Cette CMI est comprise entre 0,001 mg à 1 mg/l de sang.

Les céphalosporines les plus récentes, dites parfois de 4<sup>ème</sup> génération (céf épime, cefpirome) se montrent plus actives vis-à-vis des souches hyperproductrices de céphalosporinases. Mais toutes les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération sont inactivées à des degrés divers par les β-lactamases à spectre élargi (produites surtout par certaines souches de *K.pneumoniae*).

#### **II.3.4. Les monobactames**

L'aztréonam a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celle des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies.

## Chapitre III : La résistance bactérienne aux $\beta$ -lactamines

### III.1. Définitions de la résistance bactérienne

Plusieurs définitions de la résistance des bactéries aux antibiotiques ont été retenues. Selon certains auteurs :

- Une souche est dite « résistante » lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique, notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.
- Une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration pouvant être atteinte *in vivo*.
- Une bactérie résiste à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d'une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique [21].

Il existe plusieurs types de résistance bactérienne aux antibiotiques.

### III.2. Les différents types de résistance

#### III.2.1. Résistance naturelle [71]

La résistance naturelle ou « intrinsèque » correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre à un antibiotique. Le mécanisme de cette résistance est variable mais son support génétique est généralement chromosomique. La résistance naturelle fait partie du patrimoine génétique habituel de l'espèce. Elle est toujours transmissible à la descendance (transmission verticale) alors que la transmission horizontale est très rare ou inexistante. La résistance naturelle détermine les phénotypes « sauvages » des espèces bactériennes vis-à-vis des antibiotiques.

On peut citer les résistances naturelles des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines (pénicilline G, ampicillines et céphalosporines).

### **III.2.2. Résistance acquise [20]**

La résistance acquise correspond à l'acquisition d'une résistance à un antibiotique par une souche normalement sensible. Elle n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible, à l'inverse de la résistance naturelle qui est caractéristique de l'espèce.

La résistance acquise est évolutive, elle varie en fonction du temps, de la localisation (épidémie), de l'utilisation des antibiotiques.

L'acquisition de la résistance peut être liée à un apport plasmidique ou à une mutation chromosomique.

Cette résistance acquise observé *in vitro* et *in vivo* pour la plupart des bactéries à des antibiotiques rend nécessaire l'étude de la sensibilité des bactéries au laboratoire.

### **III.2.3. Résistance clinique [58, 69]**

Elle se traduit par l'échec thérapeutique. Plusieurs facteurs entrent en cause dans ce type de résistance :

- Facteurs environnementaux (cations, protéines inhibitrices...) ;
- La pharmacocinétique ;
- Le choix judicieux de l'antibiotique ;
- Les mécanismes développés par les bactéries.

C'est le terme ultime de l'expression de la résistance, c'est celle qui compte réellement et c'est elle qui convient d'éviter.

### **III.3. Support génétique de la résistance [62]**

La cellule bactérienne contient un matériel génétique double :

- Un chromosome, représentant le noyau de la cellule bactérienne, il est indispensable à la vie de la bactérie. Ce chromosome est constitué par un long

filament d'ADN pelotonné et qui porte un grand nombre d'informations génétiques ;

- La bactérie peut contenir, dans son cytoplasme, un ou plusieurs plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaires circulaires, extrachromosomiques, douées de réplication autonome et qui sont transmises de façon stable au cours des générations. En général, les plasmides naturels des procaryotes ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie hôte.

Le mécanisme de résistance aux antibiotiques est fonction d'une information portée par le code génétique.

La résistance peut être codée :

- Par le chromosome bactérien ; elle est dite chromosomique ;
- Ou par le plasmide ; elle est dite plasmidique [27].

### **III.3.1. Résistance chromosomique par mutation**

L'acquisition de la résistance est due à la mutation d'un gène chromosomique.

La mutation correspond à une addition, une délétion ou une substitution de bases dont la conséquence est une erreur de lecture du code génétique. Cette modification entraîne une résistance en :

- Rendant la cellule imperméable à ces antibiotiques ;
- Rendant les cibles pariétales (protéines de liaison à la pénicilline par exemple) ou intracellulaires (ADN gyrase, ARN polymérase, ribosomes), spécifiques de ces antibiotiques, indifférentes à la présence du ou des antibiotiques ;
- Codant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.

La mutation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.

Ce type de résistance est un phénomène :

- spontané,
- rare (la fréquence des mutations dans une population donnée est  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ ),

- indépendant de l'antibiotique qui n'agit qu'en tant qu'agent sélecteur en éliminant les populations sensibles,
- spécifique,
- héréditaire et stable (les fréquences de réversion sont équivalentes à celles des mutations) mais non transmissible en dehors de progénie.

### **III.3.2. Résistance par acquisition de gène**

L'acquisition d'une information génétique sous forme de plasmide entraîne la synthèse de protéines nouvelles par la bactérie réceptrice. Celle-ci initialement sensible devient résistante à un ou plusieurs antibiotiques. La résistance peut alors être due à :

- l'altération de la cible de l'antibiotique,
- la modification du transport de l'antibiotique (diminution de l'import actif ou mis en œuvre d'un export actif),
- l'inactivation de la cible et
- la substitution de la cible de l'antibiotique.

Les plasmides de résistance peuvent se retrouver au niveau du génome bactérien. A l'inverse, on peut retrouver des transposons, initialement localisés au niveau du chromosome, sur des plasmides :

Exemple : gène codant pour la pénicillinase SHV-1, d'abord naturellement trouvé sur le chromosome de *Klebsiella pneumoniae* et retrouvé ensuite sur des plasmides chez des espèces variées d'entérobactéries [10].

### **III.3.3. Résistance par dérépression de gène**

Le patrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant pour la résistance à une ou plusieurs antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, quinolones, etc.) [27].

Ce gène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène répresseur en amont. Une mutation de gène réprimé ou l'action inductrice de certains antibiotiques ( $\beta$ -lactamines) peuvent entraîner une dérépression de gène de résistance et conduisant ainsi à la sélection de souches résistantes aux molécules concernées.

Ce type de résistance est stable si une mutation est en cause, mais il régressera avec un retour au phénotype initial à l'arrêt de l'antibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.

### **III.4. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines (Figure 3)**

Les  $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique.

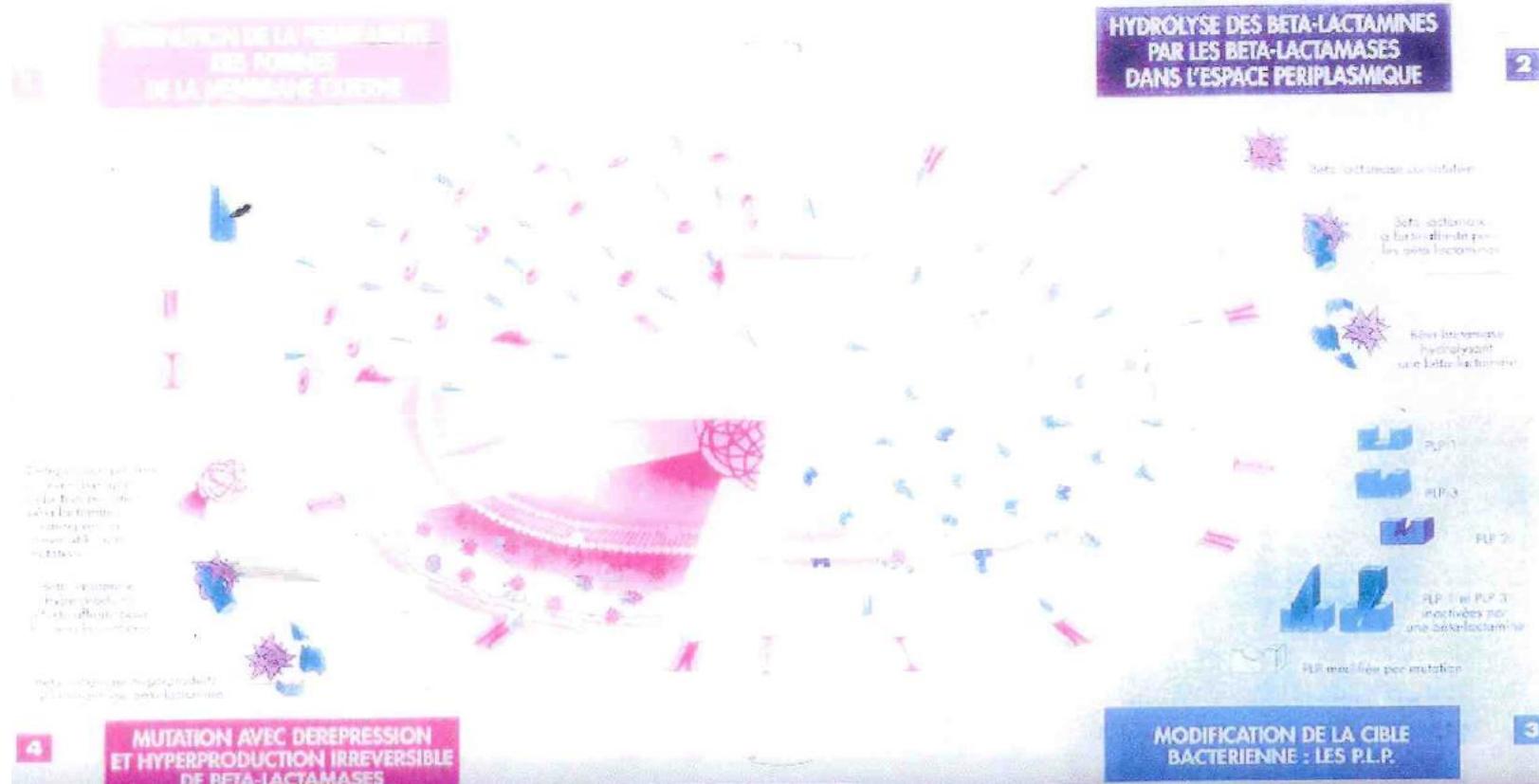
Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation sur les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) qui sont en fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du peptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique ;
- l'inactivité de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle lactamine ;
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente [20] (Tableau III).

# Résistance bactérienne aux bêta-lactamines : 4 expressions du génie bactérien



**Figure 3.** Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines

**Tableau III.** Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines [20].

Mécanismes	Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif
- Production d'une $\beta$ -lactamase	+	+++
- Imperméabilité de la paroi	-	++
- Modification des PLP	+++	+

### **III.4.1. Résistance par production d'enzymes [44, 62, 2, 57, 1, 47, 48, 55]**

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### **III.4.1.1. Les $\beta$ -lactamases**

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame. La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bactéries à Gram négatif (*E. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de « pénicillinase ».

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960. La découverte des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications de  $\beta$ -lactamases ont été proposées [19, 55, 12, 26, 72] selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leurs hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de Richmond et Sykes (Tableau IV) [45].

La figure 4 [20, 45] reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Il existe une autre classification des  $\beta$ -lactamases à large spectre déjà connue, modifiée par Payne et Amyes (Tableau V).

Schématiquement les  $\beta$ -lactamases peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

**Tableau IV.** Classification de Richmond et Sykes des  $\beta$ -lactamases des bactéries à Gram négatif [45].

Médiation	Type	Classe	Inductibilité	Activité référentielle		Inhibée par PCMB Claxa		Principaux germes
				Péni	CSP			
Chr	Case	Ia	I	-	+++	S	R	<i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i>
Chr	Case	Ib	C	-	+	S	R	<i>E. coli</i>
Chr	Case	Ic	I	-	++	S	R	<i>Proteus vulgaris</i>
Chr	Case	Id	I	-	+	S	R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Chr	Pase	II	C	++	-	S	R	<i>Proteus mirabilis</i>
P1	Case	III	C	+++	+	S	R	Médiation plasmidique type TEM
Chr	Case	IV	C	+	+	S	R	<i>Klebsiella species</i>
P1	Pase	V	C	++	-	S	R	Médiation plasmidique type OXZ, PSE

## ➤ Les pénicillinases :

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillinases sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant, on trouve chez *K. pneumoniae* une enzyme de type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE [7, 54, 44, 72].

Elles peuvent être spécifiques à un genre ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les *Haemophilus*, les *Neisseria*, les *Pasteurella*, les *Pseudomonas*. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines et les premières céphalosporines.

*P. aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM [72, 7] qui n'hydrolysent pas la ceftazidime, l'imipenème et la céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et la cefsulodine.

Depuis 1983, des  $\beta$ -lactamases à spectre très large sont apparues [54] : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE). Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de type TEM ou SHV avec des substitutions d'acides aminés proche du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propres aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital [22, 6]. Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*) [11, 17]. On compte aujourd'hui un peu plus de 300 enzymes différentes.

Récemment sont apparues :

- des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de type TEM ou de type SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1[6].
- de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (“TEM Resistant Inhibitor”) [7].

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce. Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou à haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype « céphalosporinases bas niveau » correspond généralement aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème et du mécillinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines entérobactéries (*Serratia*, *Enterobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine [28]. Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines (acides aminés, certains alcools, vitamines, etc.).

Les céphalosporines inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines entérobactéries, telles qu'*E. cloacae*, *H. alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morganii*, *P. rettgeri*, *Acinetobacter* ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *P. aeruginosa*.

L'autre moyen de produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype « céphalosporinases bas niveau ».

Ont été décrites comme mutants déréprimés des espèces telles que : *E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia spp*, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

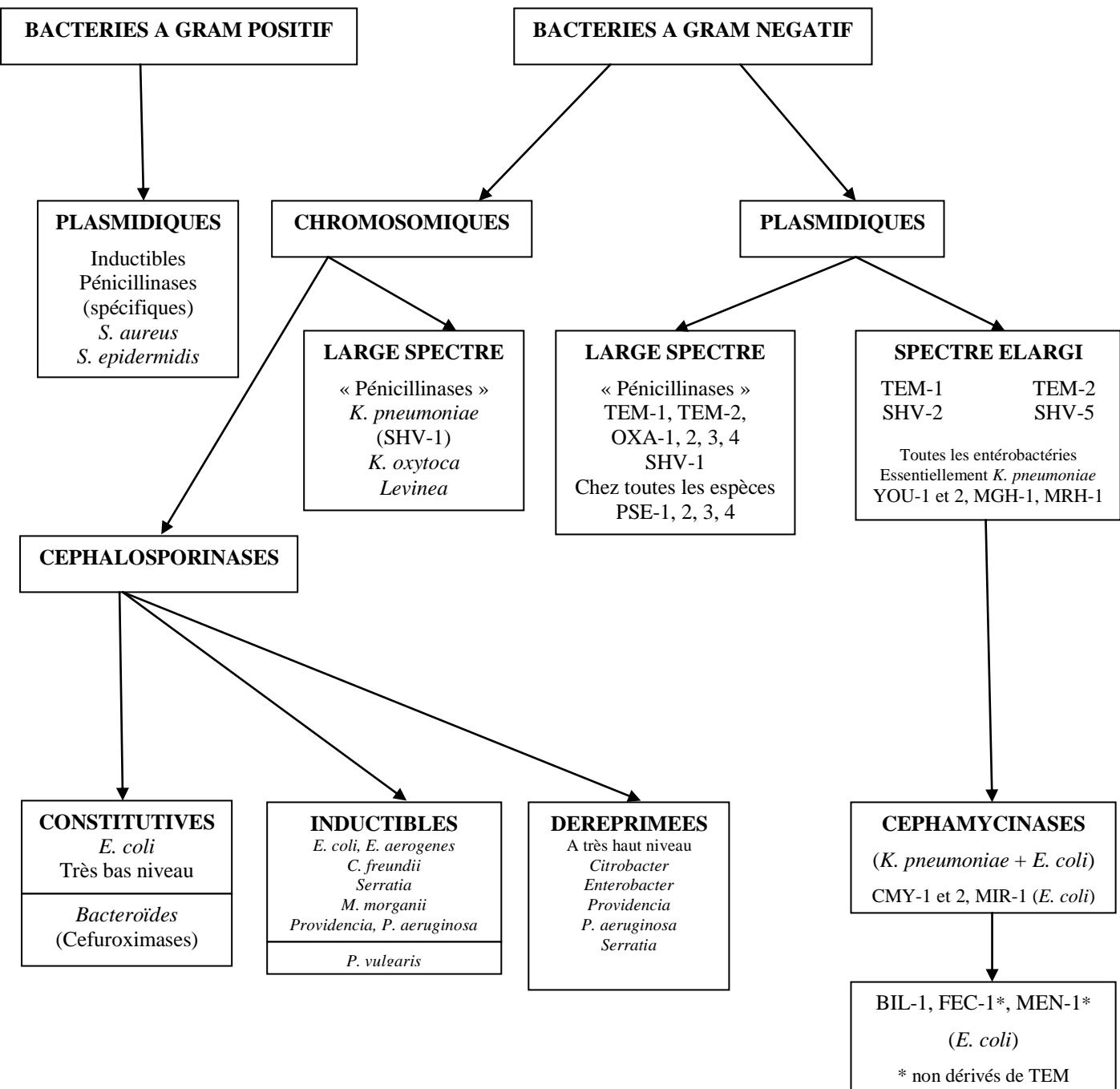
Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### **III.4.1.2. Les estérases**

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactives.

#### **III.4.1.3. Les amidases**

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide amino-7 céphalosporanique dans le cas de céphalosporines et l'acide amino-6 pénicillanique dans le cas des pénicillines.



**Figure 4.** Classification des  $\beta$ -lactamases [20, 45].

**Tableau V.** Classification déjà connue des  $\beta$ -lactamases à large spectre modifiée par Payne et Amyes.

<b>Groupes</b>	<b>Noms</b>	<b>Années</b>
1 « Céfotaximases bas niveau »	TEM-E1 TEM-E2 TEM-E4 TEM-7 CAZ-3 CAZ-10	1987 1982 NS NS 1987 1988
2 « Ceftazidimases »	TEM-E3 TEM-6 TEM-9 TEM-10 CAZ-3 CAZ-HI	1987 1986 NS 1988 1988 1988
3a « Céfotaximases haut niveau » Type TEM	TEM-E3 TEM-E4 TEM-5 CAZ-3 CAZ-6	1984 1986 1987 1987 1988
3b « Céfotaximases haut niveau » Type SHV	SHV-2 SHV-3 SHV-4 SHV-5	1983 1985 1987 1987
3c « Céfotaximases haut niveau » Type inconnu	FEC-1 DJP-1	NS 1988
« Céphalosporinases à spectre élargi » Acide clavulanique	BIL-1	1989
« Non encore classées »	FUR MJ-1 MJ-2 UNAMED-1 UNAMED-2	1988 NS NS 1986 1986

### **III.4.2. Résistance non enzymatique aux $\beta$ -lactamines**

#### **III.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau VI)**

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif.

##### **III.4.2.1.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines**

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les peptidoglycans ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du peptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe.

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles [14].

C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été la mieux étudiée.

Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC-, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

**Tableau VI.** Mécanismes de résistance non enzymatique aux  $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatifs.

<b>- Modification de porines ou de protéines de la membrane externe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entérobactéries (<i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>E. cloacae</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Serratia</i>)</li> <li>- <i>Pseudomonas</i></li> <li>- <i>Haemophilus</i></li> <li>- Gonocoque</li> </ul>
<b>- Modification des PLP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>E. coli</i></li> <li>- <i>Pseudomonas</i></li> <li>- <i>Haemophilus</i></li> <li>- Gonocoque</li> </ul>
<b>- Modification des LPS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Pseudomonas</i></li> </ul>

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC- OmpF-, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenus pour les céphalosporines de troisième génération avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10-100 X la CMI).

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les salmonelles, les klebsielles, les *Serratia* et les *Enterobacter* [9, 74, 18, 7, 38, 57].

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénems et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipénème non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

### **III.4.2.1.2. Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines**

L'efficacité des  $\beta$ -lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP.

La liaison antibiotique/cible est liée à la structure de la cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif.

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants d'*E. coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipénème due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines.

### **III.4.2.1.3. Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines**

#### **a) Altération du LPS**

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines.

#### **b) Tolérance bactérienne**

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

### **c) Persistance bactérienne**

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien.

Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques.

### **d) Résistance par les intégrons [58]**

#### **- Structure des intégrons**

Les intégrons sont constitués de deux régions 5' et 3' conservées, entre lesquelles peuvent s'intégrer une ou plusieurs cassettes. Contrairement aux transposons, les cassettes ne contiennent pas de gènes codant pour une enzyme catalysant leur mouvement. Seule, en effet, la région 5' immobile de l'intégron contient un gène *intI*, codant pour une intégrase *IntI1*, qui s'apparente aux recombinases spécifiques du site et plus particulièrement aux intégrases des bactériophages.

#### **- Mécanisme de résistance**

Au cours des années 1980, des éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés et désignés sous le nom d'intégrons. Les intégrons peuvent héberger des gènes de résistance insérés sous forme d'éléments mobiles, les cassettes. Celles-ci sont en effet intégrées ou excisées par un système original de capture de gènes capable de promouvoir efficacement la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien.

On les trouve principalement dans les bactéries à Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Campylobacter*) et parfois dans des bactéries à Gram positif. Les intégrons sont insérés dans des plasmides, des transposons ou le chromosome bactérien. En ce qui concerne les

mycobactéries, seul un « vestige » d'intégron a été découvert chez *Mycobacterium fortuitum*. Actuellement, plus de 50 cassettes ont été identifiées qui contiennent essentiellement des gènes de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques (Tableau VII).

**Tableau VII.** Cassettes de résistance aux antibiotiques décrites sur des intégrons [58].

	Intégrons de classe 1	Intégrons de classe 2	Intégrons de classe 3
<b>Espèces bactériennes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entérobactéries</li> <li>- <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>- <i>Acinetobacter</i></li> <li>- <i>Vibrio cholerae</i></li> <li>- <i>Campylobacter jejuni</i></li> <li>- <i>Corynebacterium glutamicum</i></li> <li>- <i>Enterococcus faecalis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entérobactéries</li> <li>- <i>Acinetobacter</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>- <i>Serratia marcescens</i></li> <li>- <i>Alcaligenes xylosoxidans</i></li> <li>- <i>Pseudomonas putida</i></li> <li>- <i>Klebsiella pneumoniae</i></li> </ul>
<b>Fonction des cassettes (bla<sub>IMP</sub>)</b>	<p><b>Résistance aux <math>\beta</math>-lactamines</b>  <math>\beta</math>-lactamases classes A, C et D  <math>\beta</math>-lactamases classes B (bla<sub>IMP</sub>)</p> <p><b>Résistance aux aminosides</b>  6'-acétyltransférases  3- acétyltransférases  2 "-acétyltransférases  3"-acétyltransférases</p> <p><b>Résistance au chloramphénicol</b>  Acétyltransférases  Mécanisme non enzymatique</p> <p><b>Résistance au triméthoprime</b>  Dihydrofolate réductases</p> <p><b>Résistance à la rifampicine</b>  ADP-ribosyl transférase</p>	<p><b>Résistance aux aminosides</b>  3"-acétyltransférases</p> <p><b>Résistance à la streptomycine</b>  Acétyltransférases</p> <p><b>Résistance au triméthoprime</b>  Dihydrofolate réductases</p>	<p><b>Résistance aux <math>\beta</math>-lactamines</b>  <math>\beta</math>-lactamases classes B</p> <p><b>Résistance aux aminosides</b>  6'-acétyltransférases</p>

## **Deuxième partie : Méthodologie-Résultats-Discussion-Recommandations**

### **Chapitre I : Cadre d'étude**

Ce travail a pour cadre d'étude, le laboratoire de Bactériologie-Virologie du centre hospitalier national universitaire de l'hôpital A. Le Dantec.

#### **I.1. Le CHNU A. Le Dantec**

L'hôpital Aristide Le Dantec est, depuis la réforme de 1998, un hôpital de niveau 3(hôpital national). Il a une capacité de 756 lits effectifs (1000 lits théoriques).

De plus il constitue un haut lieu de formation pour les étudiants en Médecine, Pharmacie, Odontostomatologie et aussi pour les élèves des Ecoles Paramédicales (infirmiers, sages-femmes d'Etat et techniciens de laboratoire). C'est l'une des structures hospitalières les plus importantes de la sous région. Nous y trouvons différents services de médecine et de spécialités médicales, de chirurgie et spécialités chirurgicales, mais aussi les services d'aides au diagnostic parmi lesquels le laboratoire de Bactériologie-Virologie, où nous avons réalisé une partie de notre travail.

#### **I.2. Le laboratoire de Bactériologie-Virologie**

Le laboratoire est un service hospitalo-universitaire qui a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans les domaines de la bactériologie et de la virologie. C'est un centre de référence en matière d'infections sexuellement transmissibles et un centre collaborateur ONUSIDA. C'est également le siège du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA (Afrique de l'Ouest et du Centre).

Le laboratoire abrite aussi l'observatoire des résistances aux antirétroviraux et le programme de recherche sur les vaccins anti VIH en Afrique (AAVP).

### **I.2.1. Les différentes sections du service**

Le laboratoire de Bactériologie-Virologie est un service hospitalo-universitaire.

Nous y trouvons 4 unités distinctes mais qui partagent le même service administratif (gestion-comptabilité-informatique) et des sections communes à toutes les unités (réception, salle de réception et salle de prélèvement).

Les différentes unités du LBV sont :

- ❖ L'unité d'Immunologie ;

Elle s'active essentiellement dans le suivi de l'infection à VIH par la numération des lymphocytes T CD4, dans l'étude des réponses cellulaires dirigées contre différents pathogènes (VIH, *M. tuberculosis*, *S. haematobium*, *P. falciparum*) par des méthodes immunologiques (ELISPOT, ELISA, Cytométrie de flux) et la recherche vaccinale.

- ❖ L'unité de Virologie ;

Cette unité s'occupe principalement du diagnostic immuno-virologie des infections virales (VIH, VHB et VHC).

- ❖ L'unité de Biologie Moléculaire ;

Cette unité est responsable du diagnostic et du suivi des patients vivant avec le VIH. Elle s'active aussi dans le génotypage de VIH, dans l'étude des résistances aux ARV, le suivi de la transmission mère-enfant et d'évolution des nouvelles techniques de diagnostic moléculaires.

- ❖ L'unité de Bactériologie.

Elle est composée de deux sous-unités :

- Celle des mycobactéries ;
- Celle de la bactériologie classique (cadre de notre étude)

### **I.2.2. Présentation de l'unité de Bactériologie**

L'unité de bactériologie est dirigée par une pharmacienne biologiste (Professeur de Bactériologie-Virologie) assistée par des docteurs en pharmacie comme le montre l'organigramme de l'unité de bactériologie (figure 5).

#### **I.2.2.1. L'accueil**

Le malade effectue son premier contact à ce niveau ; il y trouvera les renseignements sur les analyses, les conditions de l'analyse et la tarification. Il s'y présentera le jour de l'analyse pour y être enregistré avec un numéro de code. Cet enregistrement se fait sur feuille («listing») et par un ordinateur (fichier «accueil»).

C'est à ce niveau que les feuilles de travail sont remplies pour les différentes analyses à effectuer et les résultats y sont délivrés sous pli fermé aux malades vus à titre externe, les résultats des malades hospitalisés sont retournés aux services respectifs par le surveillant de service. La facturation est effectuée dans ce local.

#### **I.2.2.2. La salle d'attente et la salle de prélèvement**

Entre la réception et la salle de prélèvement se trouve la salle d'attente où les malades patientent en attendant leur tour de prélèvement.

La salle de prélèvement comprend trois (3) boxes : un (1) premier où s'effectuent les prélèvements de sang et deux (2) autres contigus réservés aux autres prélèvements, principalement les prélèvements génitaux.

#### **I.2.2.3. Le laboratoire de bactériologie**

Le laboratoire est divisé en plusieurs postes de travail destinés au traitement de tous les produits pathologiques. Nous distinguons :

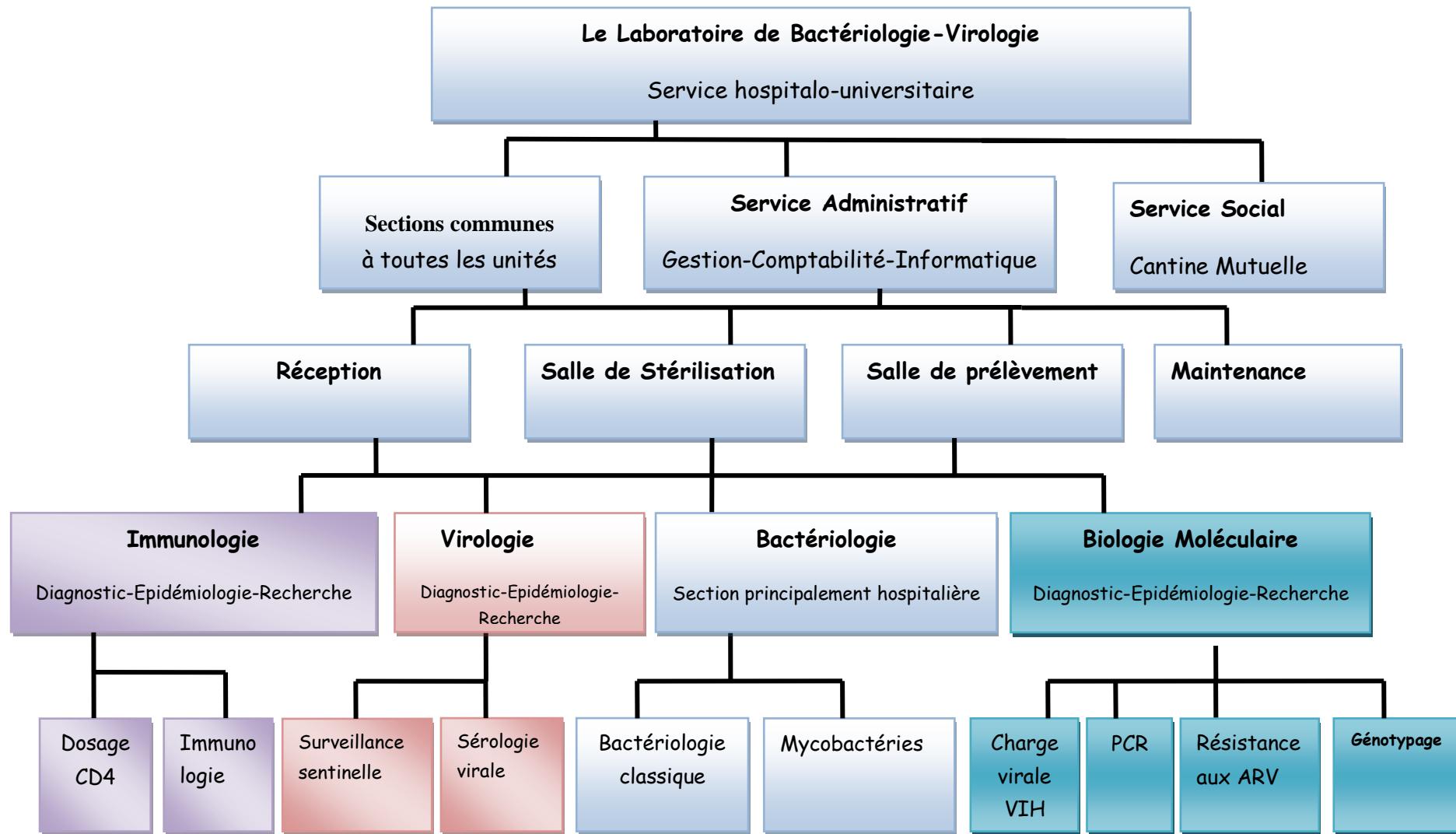
- ✓ Celui du traitement des prélèvements génitaux ;

- ✓ Celui de l'examen cytobactériologique des urines ;
- ✓ Celui du traitement du liquide céphalo-rachidien, du sang et des selles ;
- ✓ Le poste de travail où sont traités tous les autres produits biologiques ;
- ✓ Le poste de travail de la sérologie bactérienne ;
- ✓ Et enfin celui des antibiogrammes où est évaluée la sensibilité aux antibiotiques de toutes les souches bactériennes isolées et identifiées.

#### **I.2.2.4. La salle de stérilisation**

C'est une unité incontournable où s'effectue :

- ✓ La préparation des milieux de culture et réactifs, leur conditionnement et leur stérilisation ;
- ✓ La décontamination du et des produits biologiques avant leur récupération ou élimination selon le cas ;
- ✓ Le nettoyage du matériel avant recyclage.



**Figure 5.** Organigramme du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec (Juillet 2011)

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

### **II.1. Souches bactériennes**

#### **II.1.1. Souches à tester**

Les 1673 souches d'entérobactéries de notre étude, ont été isolées de divers produits pathologiques qui ont été analysés dans le laboratoire de Bactériologie du CHNU A. Le Dantec de Janvier 2011 à Juin 2013.

Ces produits pathologiques sont constitués de prélèvements d'urines, de sang, de LCR, de pus, de sécrétions génitales, de liquides d'épanchement, selles, ... provenaient de malades hospitalisés et aussi de patients externes.

#### **II.1.2. Souches de référence**

L'utilisation des souches de référence permet de vérifier la conformité des résultats du test.

Les souches de référence recommandées par le NCCLS [45] ("National Committee on Clinical Laboratory Standards") sont les suivantes :

- *Escherichia coli* ATCC ("American Type Culture Collection") 25921,
- *Escherichia coli* ATCC 35213.

Les résultats ont été interprétés conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques.

### **II.2. Traitement des produits pathologiques au laboratoire.**

Les souches bactériennes ont été isolées à partir de divers produits pathologiques traités selon les procédures standards du laboratoire de bactériologie. L'examen cytobactériologique des prélèvements comprend les étapes ci-après :

- l'examen macroscopique ;
- l'examen microscopique ;

- la mise en culture en vue de l'isolement puis l'identification du germe suspecté ;
- l'interprétation des résultats ;
- la réalisation de l'antibiogramme.

### **II.3. Identification des entérobactéries**

L'identification des entérobactéries se fait sur la base de caractères morphologiques, culturaux et biochimiques.

Pour identifier les entérobactéries au laboratoire on dispose de deux types de galeries :

- La galerie classique d'identification des entérobactéries ;
- La galerie Api 20E.

### **II.4. L'antibiogramme**

#### **II.4.1. Matériel et réactifs**

##### **• Matériel**

- Disques d'antibiotiques,
- Distributeurs de disques d'antibiotiques,
- Boites de pétrie de 120 mm de diamètre,
- Pinces stérilisables,
- Ecouvillons stériles,
- Tubes à essai stériles,
- Pipettes Pasteur stériles,
- Pipettes graduées de 10 ml stériles,
- Pied à coulisse ou règle graduée,
- Anses de platine.

- **Réactifs**

- Eau physiologique,
- Milieu : Müller Hinton,
- Etalon de Mc Farland (0,5).

#### **II.4.2. Principe de l'antibiogramme**

La technique consiste à déposer à la surface de la gélose préalablementensemencée avec une suspension bactérienne, des disques de papier buvard imprégnés des différents antibiotiques. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque et y détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque. Après 18heures d'incubation à 37°C, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne. La multiplication des bactéries s'arrête là où existe dans la gélose, une concentration d'antibiotique égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

A partir de la mesure du diamètre d'inhibition, on peut en déduire la valeur approchée de la CMI.

Des catégories sensibles, intermédiaires et résistants sont déterminées par rapport à des valeurs critiques soit :

- Des diamètres d'inhibition ou diamètres critiques D et d,
- Des concentrations d'antibiotiques ou concentrations critiques C et c.

CMI (mg/l), Diamètre (mm)

- Souche sensible (S) :  $CMI \leq c$  ; Diamètre  $\geq D$
- Souche résistante (R) :  $CMI > C$  ; Diamètre  $< d$
- Souche intermédiaire (I) :  $c < CMI \leq C$  ;  $d \leq \text{Diamètre} < D$

### **II.4.3. Technique de diffusion en gélose : méthode des disques**

#### **II.4.3.1. Préparation de l'inoculum**

- A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures ;
- Prélever 2 à 3 colonies (selon l'espèce bactérienne) et faire une suspension dans de l'eau physiologique stérile ;
- Homogénéiser délicatement au vortex ou par agitation tout en évitant la production d'aérosols ;
- Ajuster la densité à celle de l'étalement 0.5 Mc Farland.

Pour les *Enterobacteriaceae*, il faut faire une dilution au 1/10 ( $10^7$  UFC/ml) ce qui correspond à prélever 1 ml de la suspension 0,5 Mc Farland et à ajouter dans 9 ml d'eau physiologique ; pour ensemencer par écouvillonnage.

#### **II.4.3.2. Ensemencement**

Elle se fait sur milieu MH. Nous ensemencons par écouvillonnage et pour se faire :

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum ;
- Eliminer l'excès d'inoculum en pressant l'écouvillon contre les parois du tube ;
- Ensemencer par stries serrés sur toute la surface du milieu de culture à trois reprises en faisant tourner à chaque fois la boîte de  $60^\circ$  après chaque application ;
- Passer ensuite l'écouvillon sur le bord de la gélose ;
- Laisser sécher 5 minutes à côté du bec bunsen le couvercle étant fermé.

#### **II.4.3.3. Application des disques**

- Déposer les disques choisis à l'aide du distributeur ou d'une paire de pinces stérilisables ;

- Une distance minimale de 15mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boite et deux disques doivent être éloignés au minimum de 25 à 30mm ;
- Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose ;
- Pré-diffusion de 15minutes à température du laboratoire.

#### **II.4.3.4. Incubation**

L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 18-24 h.

#### **II.4.3.5. Lecture**

- Mesurer et noter le diamètre de chaque zone d'inhibition en mm à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle graduée.
- Les résultats sont rendus par rapport aux valeurs préétablies de diamètre d'inhibition ou diamètre critique à l'aide d'un abaque de lecture (le CA-SFM) disponible au laboratoire .Une bactérie peut être sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante(R).
- Interpréter les résultats obtenus en déterminant les phénotypes obtenus et les mécanismes d'action des bactéries aux antibiotiques.

### **II.5. Détection des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) par la méthode de diffusion par double disque**

#### **Principe :**

La détection des BLSE se fait par la formation d'une synergie entre des disques de céphalosporines de troisième génération (Céfotaxime, Ceftazidime) et un disque contenant l'association Amoxicilline/acide clavulanique (un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase). Et la technique utilisée est la méthode de diffusion par double disque-disque [7].

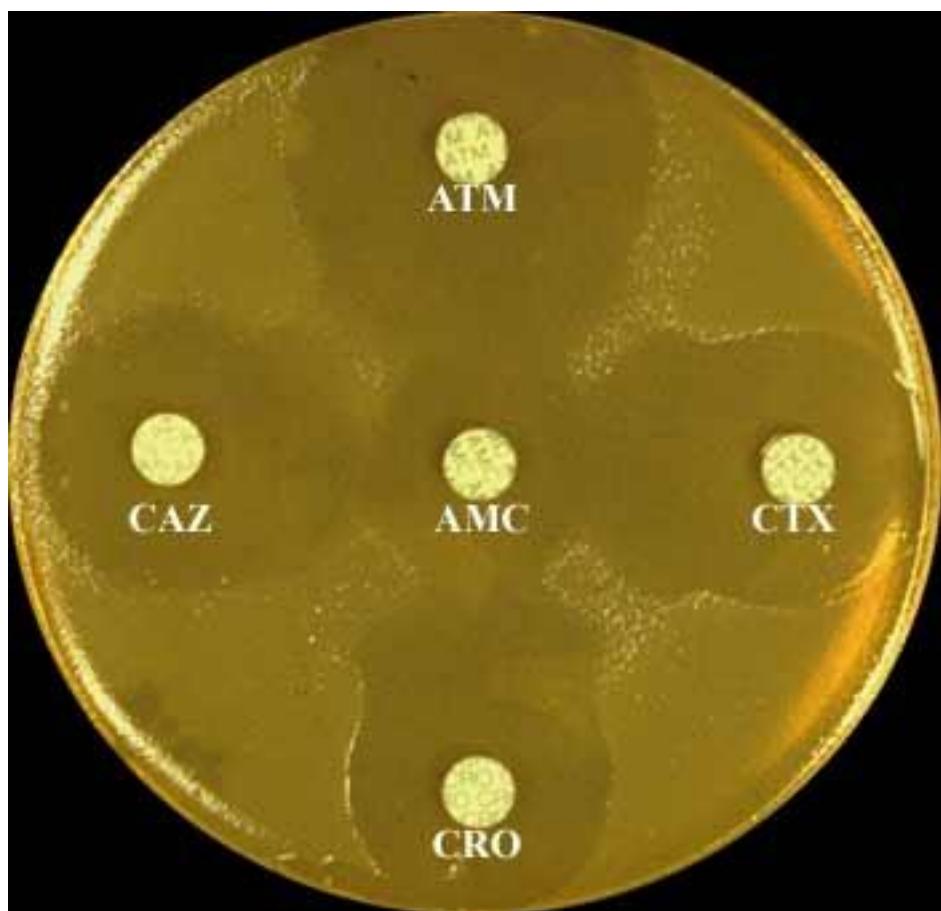
## **Technique :**

Elle consiste à placer au centre d'une gélose ensemencée avec la souche test un disque d'Amoxicilline-acide clavulanique et à 30 mm de ce disque (centre à centre), tout autour, les disques de Céfotaxime, Ceftazidime ou Aztrénam. Et on incube à 37°C à l'étuve pendant 24 heures.

## **Lecture et interprétation :**

Si la souche produit une BLSE, il y a une augmentation très nette ( $\geq 4\text{mm}$ ) ou une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque contenant l'oxyimino  $\beta$ -lactamine, et ceux en regard du disque contenant l'acide clavulanique. Ceci est classiquement décrit comme une image en « bouchon de champagne » (photo A). Celle-ci est due à l'inhibition de l'action enzymatique de l'acide clavulanique (au centre) sur la Céfotaxime et la Ceftazidime.

Il est parfois nécessaire de rapprocher les disques pour mieux voir la synergie. A partir des niveaux relatifs de résistance au Céfotaxime et à la Ceftazidime, il est possible de distinguer plusieurs variants de ce phénotype (céfotaximase, ceftazidimase). Les activités du Cefpirome et du Céf épime sur les souches de ce phénotype sont un peu moins diminuées que celles de la Céfotaxime et de la Ceftriaxone.



**Photo A.** Mise en évidence des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).

## II.6. Analyse des données

Les données ainsi collectées ont été saisies à l'aide du logiciel FileMaker Pro (version 6.0). L'analyse statistique des données a été effectué grâce au logiciel SPSS (version 16) et la confection des graphes grâce au logiciel. Les différences entre groupes ont été testées en utilisant des tests non paramétriques (Mann-Whitney U test ou Kruskal-Wallis test et par  $\chi^2$  ou Fisher exact test). Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs pour des valeurs de  $P < 0,05$ .

## Chapitre III : Résultats

### III.1. Prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE

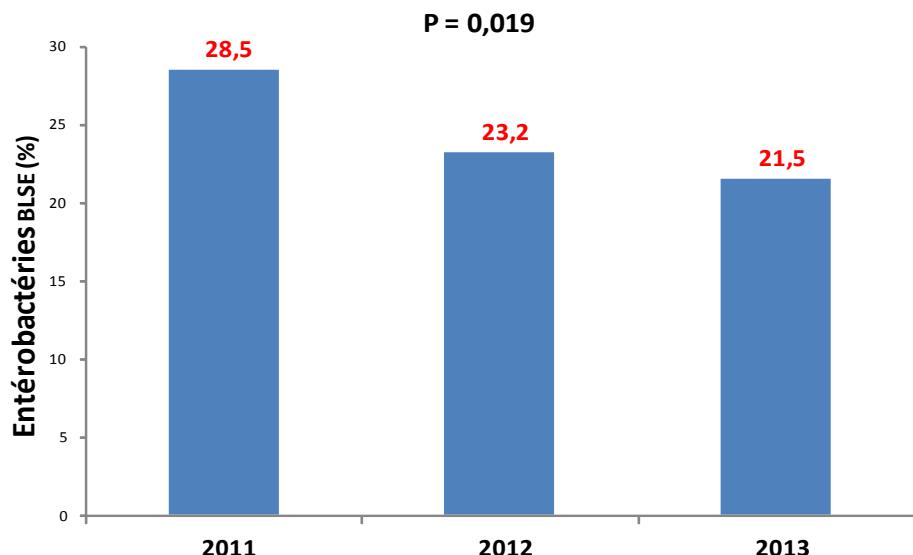
#### III.1.1. Prévalence globale

Au cours de ces années (Janvier 2011 à Juin 2013), nous avons recherché la production de BLSE à partir de 1673 souches d'entérobactéries isolées au niveau du laboratoire de Bactériologie du CHNU A. Le Dantec.

Le taux de prévalence globale des entérobactéries productrices de BLSE est élevé et est de l'ordre de (24,3%).

#### III.1.2. Evolution de la prévalence entre 2011 et 2013

Nous avons observé une diminution statistiquement significative de la prévalence des entérobactéries productrices de BLSE entre 2011 et 2013. En effet, la prévalence passe de 28,5% en 2011 à 21,5% en 2013 (figure 6 ;  $P = 0,019$ ).



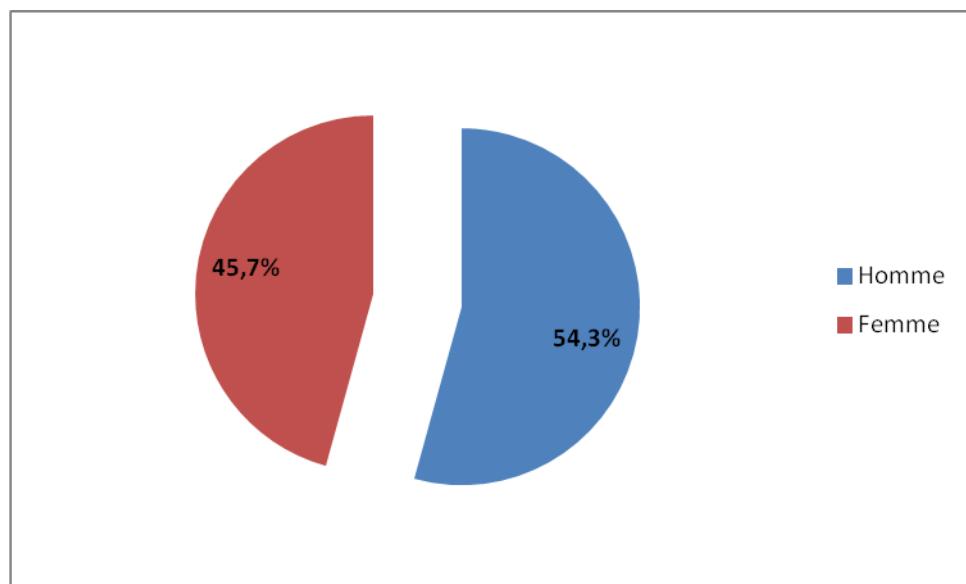
**Figure 6.** Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE entre 2011 et 2013.

### **III.2. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'âge**

La médiane d'âge des patients infectés par les entérobactéries sécrétrices de BLSE était de 40 ans (IQR, 20-60) comparée à 44 ans (IQR, 27-62) chez les patients non colonisés par ces souches ( $P = 0,002$ ).

### **III.3. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du sexe**

Les entérobactéries sécrétrices de BLSE ont été le plus souvent hébergées chez l'homme que chez la femme avec des taux respectifs de 54,3% et 45,7% ; même si la différence n'est pas statistiquement significative (figure 7 ;  $P = 0,425$ ).

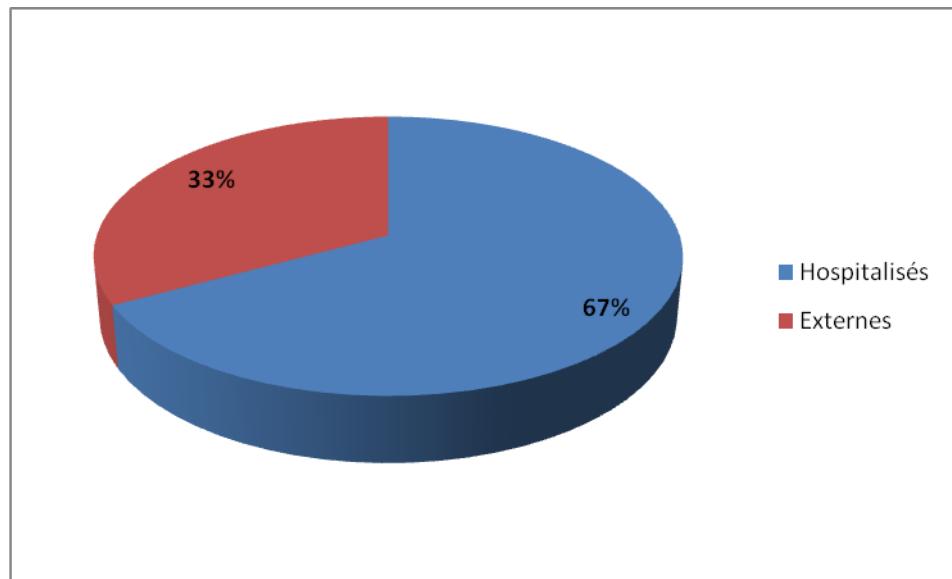


**Figure 7.** Prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du sexe.

### **III.4. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'origine**

#### **III.4.1. Prévalence globale**

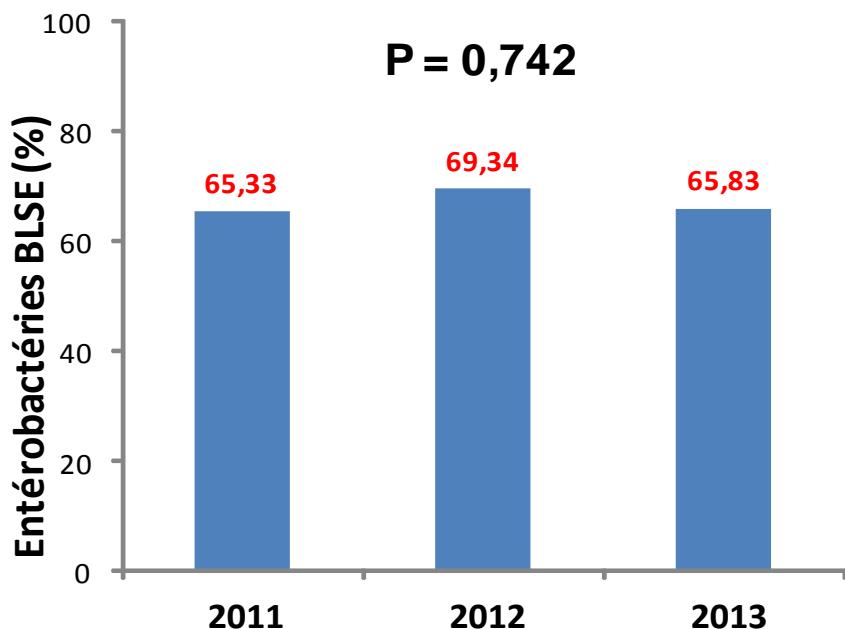
La majorité des entérobactéries productrices de BLSE ont été isolées en milieu hospitalier avec 67% des cas contre 33% en milieu communautaire (figure 8 ;  $P < 0,001$ ).



**Figure 8.** Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'origine

#### **III.4.2. Evolution de la prévalence entre 2011 et 2013**

Dans notre étude, nous n'avons pas observé une évolution significative dans la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE d'origine nosocomiale entre 2011 (65,33%) et 2013(65,83%), même si elle a atteint 69,34% en 2012 (figure 9 ;  $P = 0,742$ ).

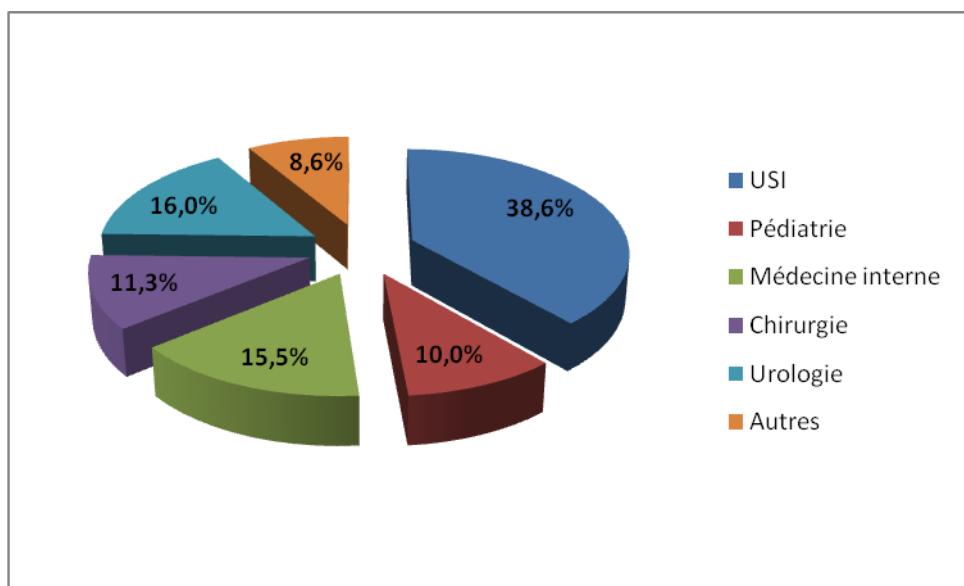


**Figure 9.** Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE entre 2011 et 2013

### **III.5. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil**

#### **III.5.1. Prévalence globale**

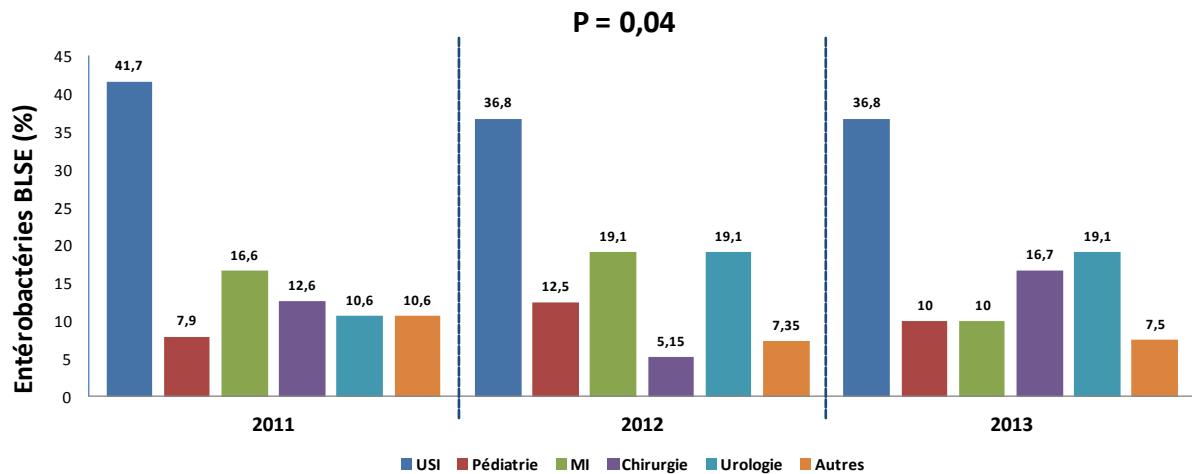
La majeure partie des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE de notre étude ont été isolées dans les unités de soins intensifs (38,6%), en urologie (16%) et en médecine interne (15,5%). Cependant, des taux non négligeables ont été observés en chirurgie et en pédiatrie, avec respectivement 11,3% et 10% (figure 10).



**Figure 10.** Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil.

### III.5.2. Evolution de la prévalence entre 2011 et 2013

La distribution des prévalences des entérobactéries sécrétrices de BLSE n'a pas connu une importante évolution entre les différents services d'accueil entre 2011 et 2013. En effet, les prévalences les plus élevées sont toujours observées dans les unités de soins intensifs, avec respectivement 41,7% en 2011 et 36,8% en 2012 et 2013. La médecine interne, qui occupait la deuxième dans cette prévalence jusqu'en 2012, a été supplantée en 2013 par la chirurgie et l'urologie, avec respectivement 16,7% et 19,1% (figure 11 ;  $P = 0,04$ ).



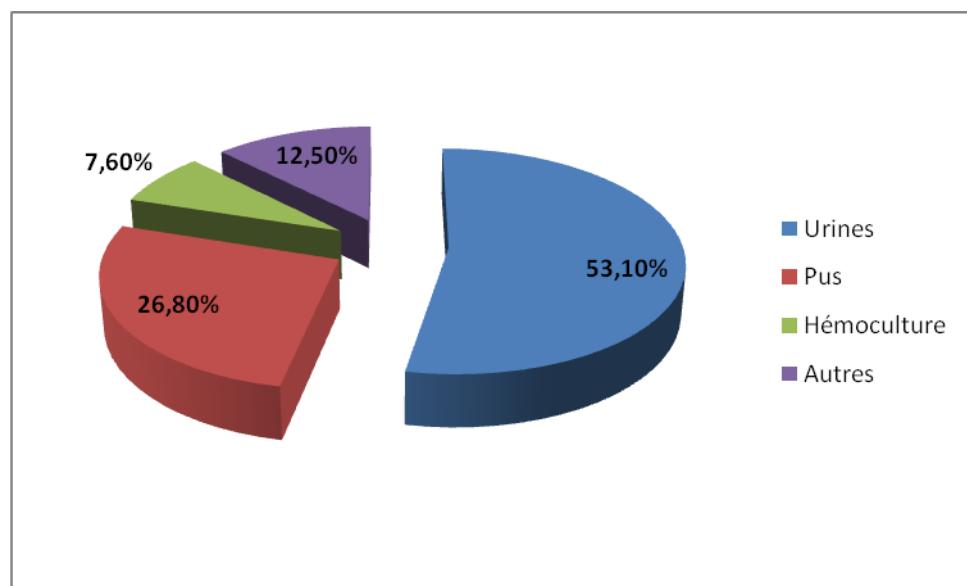
**Figure 11.** Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil

**USI** : Unité des soins intensifs ; **MI** : Médecine interne

### III.6. Distribution des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique

#### III.6.1. Prévalence globale

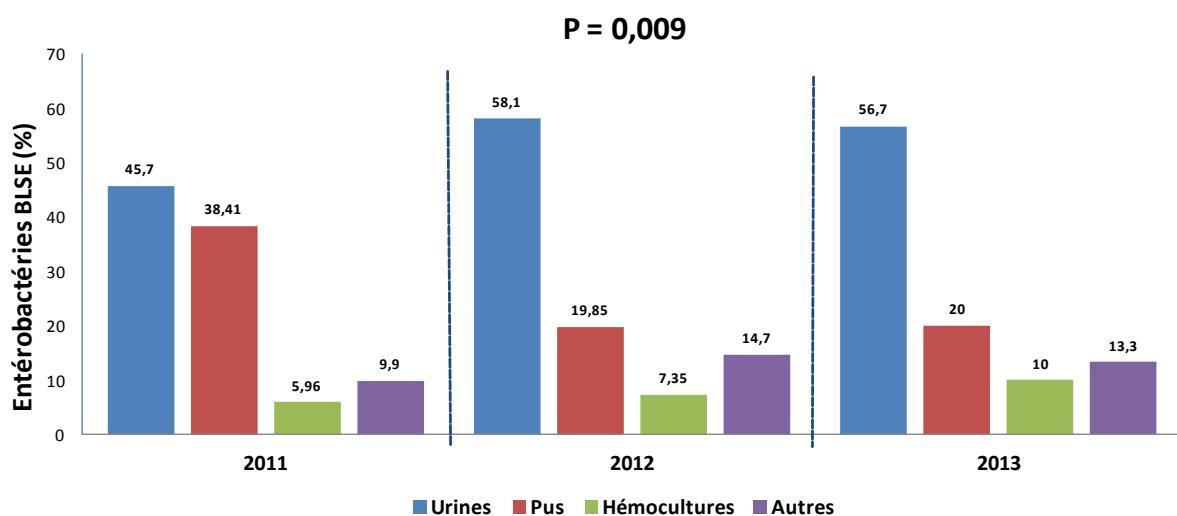
Les entérobactéries sécrétrices de BLSE provenaient principalement des prélèvements d'urines (53,1%) et de pus (26,8%). Par contre, 7,6% seulement de ces souches ont été isolées des hémocultures (figure 12).



**Figure 12.** Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique.

### III.6.2. Evolution de la prévalence entre 2011 et 2013

Au cours de ces trois années, nous avons une distribution constante dans la prédominance des produits pathologiques à partir desquels ont été isolées ces entérobactéries multirésistantes. En effet, les entérobactéries sécrétrices de BLSE sont toujours majoritairement retrouvées dans les prélèvements d'urines et de pus, avec respectivement 45,7% et 38,41% en 2011, 58,1% et 19,85% en 20112, et 56,7% et 20% en 2013(figure 13 ; P = 0,009). Cependant, nous avons noté une augmentation progressive de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE au cours de ces trois années dans les hémocultures, avec respectivement 5,96% en 2011, 7,35% en 2012 et 10% en 2013.



**Figure 13.** Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique.

### III.7. Distribution des souches sécrétrices de BLSE en fonction du germe

#### III.7.1. Prévalence globale

Parmi les entérobactéries sécrétrices de BLSE, *Klebsiellae spp* est le plus fréquent avec un taux de 42%, dont 92,4% sont des *K. pneumoniae*, suivie d'*E. coli* (34,9%). Nous avons également observé un taux important d'*Enterobacter spp* (18%) sécrétrices de BLSE (figure 14).

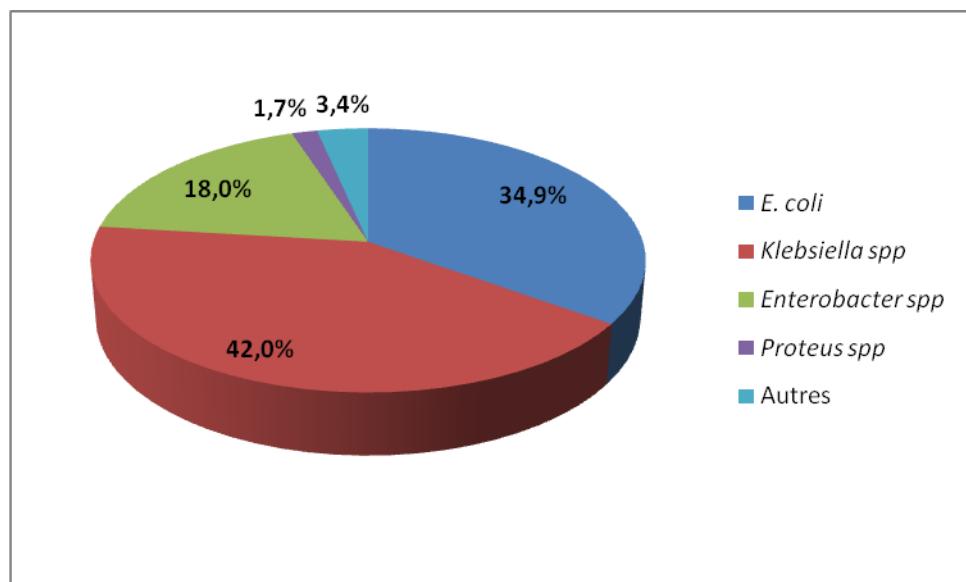
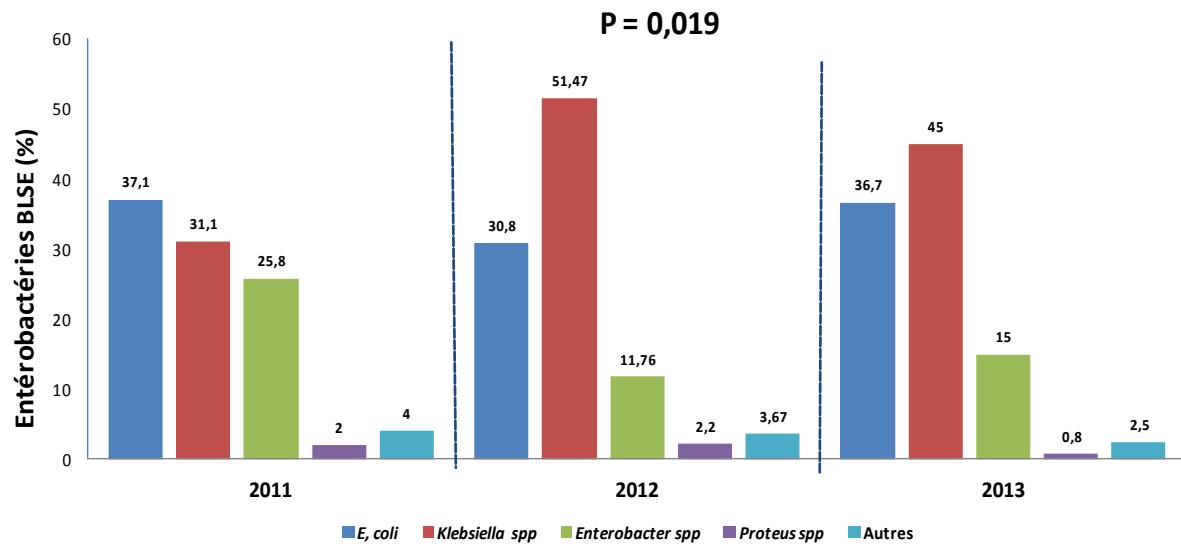


Figure 14. Prévalence globale des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du germe.

#### III.7.2. Evolution de la prévalence entre 2011 et 2013

La prédominance dans la prévalence des espèces sécrétrices de BLSE a significativement évolué entre 2011 et 2013 (figure 15 ;  $P = 0,019$ ). Durant l'année 2011, parmi les entérobactéries BLSE, *E. coli* était l'espèce la plus fréquemment isolée avec 37,1%, suivie de près par *Klebsiella spp* 31,1% et d'*Enterobacter spp* 25,8%. Par contre, pour les deux dernières années, *Klebsiella spp* est passée devant *E. coli* avec 51,47% en 2012 et 45% en 2013 des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE. *Enterobacter spp* conserve

toujours la troisième place, avec cependant une prévalence évoluant en dents de scie (25,8% en 2011, 11,76% en 2012 et 15% en 2013).



**Figure 15.** Evolution de la prévalence des entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du germe.

### III.8. Profil de sensibilité des souches sécrétrices de BLSE

#### III.8.1. Résistance globale

Le tableau VIII donne une vue d'ensemble sur le profil de sensibilité des entérobactéries sécrétrices de BLSE isolées dans notre étude. Toutes les souches sécrétrices de BLSE étaient résistantes à l'amoxicilline, à la ticarcilline, au pipéracilline, à la céfalotine et au céfamandole. Ces bactéries ont également développé des taux importants de résistance vis-à-vis de l'association acide clavulanique/amoxicilline (69,6%) et des autres bêta-lactamines telles que l'aztréonam (75,1%), aux céphamycines (céfoxidine 56% ; céfixime 93,2%), aux C3G (céfotaxime ou ceftriaxone 94,3% ; ceftazidime 83,3%). En outre, la majorité des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE avait associé une résistance au complexe sulfaméthoxazole/triméthoprime (88,7%), à la Ciprofloxacine (76,8%), à la Gentamicine (69,1%), et à la tétracycline (62,2%).

Par contre, la fosfomycine, l'amikacine et à un degré moindre le chloramphénicol concernent une bonne activité sur ces souches, avec respectivement 93,5%, 89,9% et 67,3% de taux d'efficacité.

Fait intéressant, toutes les entérobactéries sécrétrices de BLSE demeurent très sensibles à l'imipenème (excepté une souche).

**Tableau VIII.** Pourcentage globale de résistance des entérobactéries sécrétrices de BLSE aux antibiotiques.

Antibiotiques testés	% de résistance des entérobactéries BLSE
Amoxicilline	100
Ticarcilline	100
Pipéracilline	100
Céfalotine	100
Céfamandole	100
Amoxicilline + acide clavulanique	69,6
Céfoxitine	56
Céfotaxime ou Ceftriaxone	94,3
Ceftazidime	83,3
Cefixime	93,2
Aztréonam	75,1
Imipenème	0,67
Fosfomycine	6,5
Amikacine	10,1
Gentamycine	69,1
Chloramphénicol	32,7
Tétracycline	62,2
Ciprofloxacine	76,8
Cotrimoxazole	88,7

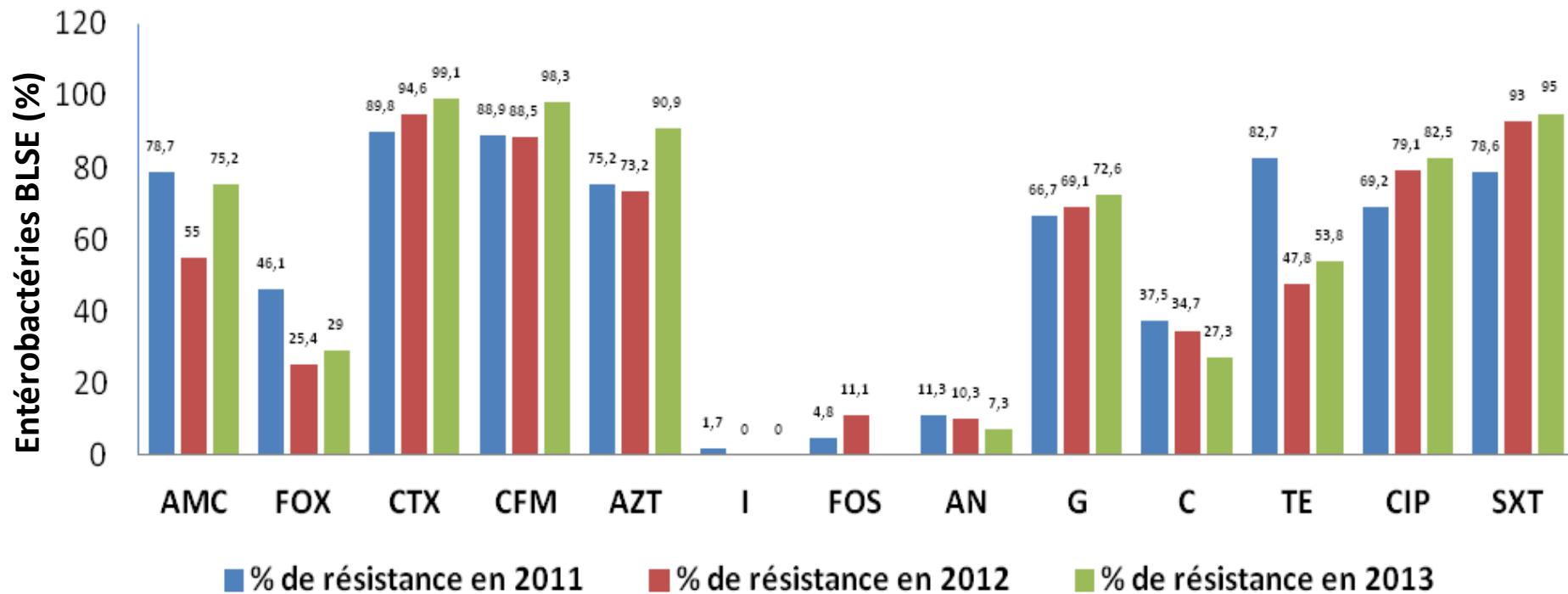
### **III.8.2. Evolution de la résistance entre 2011 et 2013**

L'évolution de la résistance des entérobactéries sécrétrices de BLSE aux antibiotiques au cours de ces trois dernières années est statistiquement significative pour l'acide clavulanique + amoxicilline ( $P \leq 0,001$ ), la céfoxidine ( $P \leq 0,002$ ), la céfotaxime ( $P \leq 0,034$ ), la tétracycline ( $P \leq 0,001$ ), et la cotrimoxazole ( $P \leq 0,02$ ). Par contre elle n'est pas significative pour la céfixime, l'aztréonam, l'imipénème, la fosfomycine, l'amikacine, la gentamycine, le chloramphénicol et la ciprofloxacine ( $P \leq 0,05$ ).

Pour l'association amoxicilline/acide clavulanique, nous avons noté un fort taux de la résistance en 2011 de l'ordre de 78,7%, qui ensuite diminue jusqu'à 55% en 2012 avant de rebondir en 2013 pour atteindre 75,2%.

Pour la résistance des souches vis-à-vis de la céfoxidine et de la tétracycline, l'évolution est décroissante passant respectivement de 46,1% et 82,7% en 2011 à 29% et 53,8% en 2013.

Par contre, celle-ci connaît une croissance pour la céfotaxime et le cotrimoxazole avec des taux respectifs de 89,8% et 78,6% en 2011, 99,1% et 95% en 2013 (figure 16).



**Figure 16.** Evolution de la résistance des entérobactéries sécrétrices de BLSE entre 2011 et 2013

**AMC** : Acide clavulanique + Amoxicilline ; **FOX** : Céfoxitine ; **CTX** : Céfotaxime ; **CFM** : Céfixime ; **ATM** : Aztréonam ; **I** : Imipénème ; **FOS** : Fosfomycine ; **AN** : Amikacine ; **GM** : Gentamycine ; **C** : Ciprofloxacine ; **TE** : Tétracycline ; **CIP** : Ciprofloxacine ; **SXT** : Cotrimoxazole.

## Chapitre IV : Discussion

L'objectif principal de notre étude était de déterminer la prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi isolées au laboratoire de Bactériologie du CHNU Aristide Le Dantec de Janvier 2011 à Juin 2013. L'étude de la sensibilité des antibiotiques a été effectuée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. La détection de BLSE a été effectuée, par synergie entre un disque d'amoxicilline /acide clavulanique et un disque de céphalosporine de troisième génération, sur 1673 souches d'entérobactéries.

### IV.1. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE

Les bactéries productrices de BLSE constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques. Les BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à Gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés [22].

Les résultats de notre étude ont montré un taux de prévalence d'entérobactéries sécrétrices de BLSE relativement élevé, de l'ordre de 24,32%. Cette prévalence a diminué de façon assez significative entre 2011 et 2013 en passant de 28,54% en 2011 à 21,54% en 2013. Une étude menée par Ndiaye AOK [46] au CHNU de Fann a montré des taux de prévalence de 5,05% en 2000, 23,85% en 2001, 33,49% en 2002, 15,6% en 2003 et 22,02% en 2004. Nos résultats sont en phase avec les très fortes prévalences de résistance retrouvées dans la sous région. En effet, une étude de Dioman SA [15], réalisée au Mali, a rapporté 20,3% en 2004, 21,3% en 2005 et 26,8% en 2006 ; même si ici on note une certaine augmentation de la prévalence. Les données du réseau CCLIN Paris Nord (Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter région Nord) avaient déjà montré une incidence des

entérobactéries sécrétrices de BLSE en constante augmentation depuis quelques années [77].

Ce phénomène est mondial et concerne aussi bien le continent nord et sud-américain [60] que l'Asie [25] et l'Europe [37].

#### **IV.2. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'espèce**

*Klebsiellae pneumoniae* semble être le producteur N° 1 de BLSE, suivie d'*E. coli*, d'après de nombreuses études [2, 22, 43, 64, 70].

Dans cette présente étude, *Klebsiellae spp* ne fait pas exception à la règle représentant 42% des souches isolées, ensuite viennent *E. coli* 34,9%, *Enterobacter spp* 18%, les autres espèces étant moins représentées. Ndiaye AOK [46], a rapporté des résultats similaires pour *K. pneumoniae* 38,07%, *E. coli* 37,16%, *Enterobacter spp* 11,01%. Des études menées dans la sous région ont donné des résultats identiques ; celle de Dioman SA [15], a montré que la fréquence de production de BLSE était de 42,8% pour *K. pneumoniae*, 26% pour *E. coli*, et 30% pour le couple *Enterobacter cloacae* et *K. oxytoca*. En 2005 au Maroc [42], *K. pneumoniae* sécrétrice de BLSE représentait 28,26% des souches isolées, ensuite viennent *E. coli* 27,17% et *Enterobacter cloacae* 15,21%. Il faut, cependant, noter que certaines études détrônent *K. pneumoniae* de la place qu'elle occupait, et placent *E. aerogenes* au 1<sup>er</sup> rang des entérobactéries productrices de BLSE [34]. Ce phénomène a été observé en France, aux USA et en Espagne [34]. De même, une étude menée dans un hôpital du Sud de la France de 1999 à 2007, plaçait *E. coli* à la première place en termes de fréquence d'isolement de bactéries productrices de BLSE. L'espèce *E. aerogenes*, majoritaire en 1999 (48,7 % des souches) ne représentait plus que 18,8 % des souches en 2007. A l'inverse, *E. coli* BLSE (10,5 % des souches en 1999) représentait 37,5 % des souches en 2007. Cette inversion de tendance est

à relier à l'émergence dans la communauté de BLSE de type CTX-M, liée plus spécifiquement à *E. coli* [61, 3].

#### **IV.3. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction de l'origine**

La prévalence des entérobactéries productrices de BLSE est plus élevée en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. Néanmoins, notons que la prévalence chez les patients externes n'est pas négligeable avec 33% des cas. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec ceux de la littérature actuelle [60, 25, 37, 76]. Longtemps limitée au milieu hospitalier, l'épidémiologie des entérobactéries sécrétrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (EBLSE) s'est considérablement modifiée depuis les années 2000. En France, une première étude épidémiologique effectuée en milieu urbain mais hors d'un contexte hospitalier de décembre 1996 à mars 1997 avait mis en évidence que 0,5 % des souches d'entérobactéries étaient sécrétrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi [23]. On assiste depuis à une diffusion des entérobactéries sécrétrices de BLSE en milieu communautaire. En effet, les données du réseau CCLIN Paris-Nord (Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter région Nord) révèlent des densités d'incidence de 0,21 cas pour 100 admissions [77], chiffres en constante augmentation depuis quelques années [39]. Ainsi, dans un travail réalisé à Barcelone entre 2001 et 2002, les auteurs ont noté une augmentation du pourcentage de patients non hospitalisés porteurs d'entérobactéries sécrétrices de BLSE : ce pourcentage atteignait 7,5 % des patients en 2002 mais était seulement de 2,1 % en 2001 [73]. Une étude israélienne récente a rapporté que 13,7 % des souches d'entérobactéries prélevées au moment de l'admission des patients à l'hôpital possédaient une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi. De même, 10,8 % des 241 patients dépistés étaient porteurs d'entérobactéries sécrétrices de BLSE [5]. Plus récemment, une étude

réalisée en Arabie saoudite [29] a identifié un taux de portage d'entérobactéries sécrétrices de BLSE de 13,5 % chez les sujets sains et de 26,1 % chez les sujets hospitalisés.

Des systèmes de surveillance ont permis de constater, à l'inverse des prévisions, une diffusion des BLSE non pas de l'hôpital vers la communauté, mais l'émergence autonome de BLSE dans la communauté, qui menace de diffuser dans nos hôpitaux. De ce fait, l'augmentation des entérobactéries sécrétrices de BLSE est maintenant observée partout dans le monde non seulement dans les infections nosocomiales, mais aussi dans les infections communautaires [61, 3].

#### **IV.4. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du service d'accueil**

Les souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées au cours de nos études, sont issues majoritairement des services des unités de soins intensifs (USI) tels que la réanimation [55] avec un pourcentage de 38,6%. En effet, les patients hospitalisés au sein de ce service présentent plus de risques à contracter une BLSE [70], vu la durée d'hospitalisation (qui est généralement longue), la sévérité de la maladie, l'usage d'un certain nombre de dispositifs invasifs (sondes urinaires, cathéters, ventilation, intubation...), et les traitements antibiotiques multiples notamment avec les céphalosporines à large spectre [2, 70, 26]. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus des études menées au Maroc par Mouna B [42] et en Suisse par Mirabaud. MI [40], rapportant respectivement 46,74% et 26,1%. Cependant, une étude menée à Fann par Ndiaye AOK [46], avait donné la première place au service de médecine interne avec un taux relativement élevé de 63,3%.

#### **IV.5. Prévalence des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE en fonction du produit pathologique**

Dans notre étude, 53,1% des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE ont été isolées au niveau du tractus urinaire. Ceci confirme les résultats rapportés par une étude menée au CHU de Fann par Ndiaye. AOK [46], qui étaient de 53,67%. Dans la sous région, nos résultats sont en phase avec des études menées au Maroc en 2008 par Mouna B [42] et au Mali de 2004 à 2006 par Dioman. SA [15], donnant respectivement des prévalences de 46,73% et 64,4%. Des prévalences similaires avaient déjà été rapportées en 1999 par une étude menée dans un hôpital universitaire à Paris par Lucet et al, dans laquelle les infections du tractus urinaire à entérobactéries productrices de BLSE représentaient 52%. En Suisse de 2006 à 2007, les résultats ont montré une forte prévalence d'entérobactéries sécrétrices de BLSE dans les prélèvements urinaires, soit 74,4%.

Les principaux facteurs de risques de colonisation, puis d'infections urinaires nosocomiales, sont la dépendance fonctionnelle et surtout la mise en place d'une sonde urinaire, qui doit être posée suite à une indication précise, puis retirée le plus rapidement possible. Le respect de ces indications à côté de la mise en place de mesures d'isolement et la mise en œuvre de consignes d'hygiènes, ont permis, d'après une étude menée dans un service de médecine interne gériatrique, de diminuer de 52% l'incidence des infections à entérobactéries productrices de BLSE au CHU d'Amiens [30].

#### **IV.6. Profil de sensibilité des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE**

Face à l'apparition de nouvelles résistances aux antibiotiques chez les entérobactéries, l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques est devenue indispensable.

Toutes les souches sécrétrices de BLSE étaient résistantes à l'amoxicilline, à la ticarcilline, au pipéracilline, à la céfalotine et au céfamandole. Ces bactéries ont également développé des taux importants de résistance vis-à-vis de l'association acide clavulanique/amoxicilline (69,6%) et des autres bêta-lactamines tels que l'aztréonam (75,1%), aux céphamycines (céfoxidine 56% ; céfixime 93,2%), aux C3G (céfotaxime ou ceftriaxone 94,3% ; ceftazidime 83,3%). Ces résultats sont superposables avec ceux obtenus au Mali par Dioman. SA [15], à l'hôpital du point G de 2004 à 2006 : 100% de résistance à l'amoxicilline, à la ticarcilline, à la céfalotine, 61,4% à l'acide clavulanique + amoxicilline, 97% à la céfotaxime, 70,4% à la ceftazidime, 9,7% à la colimycine, 7,3% à l'amikacine. Cependant, la céfoxidine et la ceftazidime sont actives sur ces souches d'entérobactéries productrices de BLSE.

Les plasmides codant pour les gènes de BLSE entraînent souvent une résistance à d'autres antibiotiques tels que les aminoglycosides, le chloramphénicol, l'association sulfamide/triméthoprime, les cyclines et les fluoroquinolones [22, 70]. Ceci expliquerait la fréquence des résistances observées dans notre étude particulièrement élevée avec l'association sulfamide/triméthoprime (88,7%), à la ciprofloxacine (76,8%), à la Gentamicine (69,1%) et à la tétracycline (62,2%). Cependant, l'amikacine conserve une certaine efficacité sur environ 90% des souches. Il en est de même avec la fosfomycine sur 93,5% des souches et à un degré moindre le chloramphénicol (67,3%).

D'autre part, une même souche peut posséder deux enzymes différentes telles qu'une CTX-M et une SHV. Cette première hypothèse a fait l'objet de nombreuses études, parmi lesquelles celle menée par Oteo et al [52], (1962 souches d' *E. coli* collectées dans 27 hôpitaux en Espagne) qui ont pu montré que le niveau de résistance aux antibiotiques non bêta-lactamines était plus important pour les souches productrices de BLSE que pour les souches non productrices (cotrimoxazole 77,3% contre 32,9%, ciprofloxacine 63,3% contre 17,2% et gentamicine 16,7% contre 6,3%, respectivement). Aussi, dans une étude effectuée en Espagne, les pourcentages de résistance au sein de 285 souches d'entérobactéries productrices de BLSE communautaires et de patients hospitalisés étaient de 27,4% à la gentamicine et à la tobramycine, 6,7% à l'amikacine, 29,1 % au chloramphénicol, 61,7 % aux sulfamides, 52,3 % à la triméthoprime et 37,2 % à la ciprofloxacine [55]. De même, les auteurs d'une étude française menée au sein des établissements de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) de 2003 à 2005 ont mis en évidence un pourcentage important de corésistance : 58 %, 76 %, 43,5 % et 67,5 % des souches étaient respectivement résistantes à la gentamicine, à la tobramycine, à l'amikacine et à la ciprofloxacine [51].

Parmi les corésistances connues nous observions au niveau des aminosides un phénotype TNA (aac (6')). Il apparaît, selon nos résultats mais aussi dans d'autres études, que l'amikacine est moins touchée que la gentamicine [50, 41, 68]. Cette sensibilité aux aminosides selon les résultats de Morosini [41] semble varier en fonction du type de BLSE. Les résistances à l'amikacine et la gentamicine sont respectivement pour CTX-M9 (6,3 %–20,6 %), CTX-M14 (0 %–4,4 %), SHV (2,3 %–26,1 %), TEM (35,5 %–71,1 %).

Dans notre étude, 76,8% des souches sécrétrices de BLSE avaient associé une résistance à la ciprofloxacine. Des résultats discordants ont été rapportés par Paterson et al, qui ont montré, d'après une étude effectuée dans 18 hôpitaux et 7

pays, que 18% seulement des souches BLSE étaient également résistantes à la ciprofloxacine [58]. La résistance aux quinolones est très souvent présente chez les entérobactéries productrices de BLSE. Des études menées dans différents pays concluent que les souches CTX-M14, CTX-M15 sont plus en relation avec une résistance à la ciprofloxacine que les autres BLSE [33,73]. La diminution de sensibilité à cette classe d'antibiotique peut être due soit à une mutation chromosomique (gyr A, par C), un mécanisme d'efflux, une imperméabilité, un plasmide (protéine type qnr), une enzyme (aac (6')-Ib-cr).

L'augmentation de la résistance à ces familles d'antibiotiques limite leur utilisation en cas d'infection à germes BLSE et la rend problématique. Cette augmentation fait des carbapénèmes (imipénème et méropénème) les antibiotiques de choix dans le traitement de ce genre d'infections [59, 70], du fait de leur grande résistance vis-à-vis de l'action hydrolytique des BLSE [70]. Actuellement, l'imipénème et l'association bêta-lactamines/inhibiteur de bêta-lactamases sont souvent les plus utilisés en milieu hospitalier ; chez les immunodéprimés, les patients ayant déjà subit avec des C3G, et dans les services de réanimation [16] où règne une forte prévalence d'entérobactéries productrices de BLSE, ce qui constitue un risque de sélection de germes résistants aux carbapénèmes. C'est d'ailleurs le cas pour une souche de *K. pneumoniae* résistante à toutes les β-lactamines y compris à l'imipénème, qui a été isolé dans le laboratoire de Bactériologie du CHNU durant une étude rétrospective sur une période de 12 mois (du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre 2011), [8] et auparavant chez six patients d'un service de chirurgie en région parisienne en 2004 [27]. Il est intéressant de noter que dans notre étude toutes les entérobactéries sécrétrices de BLSE isolées ont été très sensibles à l'imipénème (excepté une souche).

## Chapitre V. Recommandations

Face à l'accroissement croissant de la résistance des bactéries à Gram négatif et en particulier l'émergence des entérobactéries sécrétrices de BLSE, il apparaît nécessaire d'élaborer des recommandations spécifiques pour une meilleure prise en charge de ces microorganismes multirésistants.

Ces recommandations ont pour objectif d'optimiser la détection des germes producteurs de BLSE au laboratoire et de tenter d'apporter des réponses pratiques sur les mesures utiles à appliquer en matière de prévention, de surveillance et de contrôle de la transmission croisée de ces bactéries.

### **V.1. Prise en charge des infections nosocomiales [53, 54, 13, 32, 24]**

Les infections nosocomiales constituent une réalité de l'hôpital, qu'il est nécessaire de combattre afin de réduire leurs effets néfastes sur le traitement des patients.

Ainsi, la lutte contre ces infections va nécessiter :

- **Une prise en charge curative** : le traitement d'une infection à bactéries résistantes doit être fondé sur des critères diagnostiques solides, car il n'existe pas de spécificité du traitement antibiotique au seul motif de la résistance. Mais devant des infections sévères qui ne peuvent pas attendre les résultats du laboratoire, le clinicien peut établir un schéma thérapeutique. Cependant, il faut éviter l'association d'antibiotiques bactéricides et bactériostatiques, car elle entraîne la résistance du germe dans l'organisme ;
- **Une prise en charge préventive** : c'est l'antibioprophylaxie qui est indiquée à chaque fois que le taux d'infection post-opératoire est élevé pour une étude donnée et/ou à chaque fois que le risque d'infection post-opératoire n'est pas acceptable compte tenu de sa gravité ;
- **Les conditions d'hygiène** : qui concernent les acteurs suivants :

- ✓ Le malade : il doit prêter une attention particulière à son hygiène corporelle et vestimentaire ;
  - ✓ Le visiteur : il doit respecter les règles d'hygiène, un bain ou un lavage des mains avec une solution hydro-alcoolique est indiqué, une fois chez lui ;
  - ✓ Le personnel hospitalier : les précautions générales impliquent la désinfection des mains avec une solution hydro-alcoolique par chaque soignant, avant et après chaque contact avec le patient. Si les mains sont visiblement souillées, il faut d'abord les laver avec de l'eau et du savon et les sécher avant de les frictionner avec la solution hydro-alcoolique. Si un contact avec le sang ou les liquides corporels du patient est probable, il faut prendre des précautions afin d'éviter le contact direct avec ceux-ci. A cette fin, il faut mettre des gants, éventuellement une sur blouse à manches longues et parfois un masque. Après avoir ôté les gants, les mains doivent être désinfectées avec une solution hydro-alcoolique. Toutes les mesures doivent être prises pour éviter des accidents par piqûre ou coupure.
- **L'environnement hospitalier** : cette approche sera également appliquée dans un cadre plus large comme lors du traitement du linge, l'évacuation des déchets de soin, l'entretien quotidien des surfaces fréquemment touchées de la chambre.

## V.2. Le bon usage des antibiotiques

Le bon usage des antibiotiques est un facteur d'importance primordiale à prendre en compte dans la prévention ou le traitement des maladies infectieuses.

Il implique le respect de trois actes :

➤ **La prescription** : la prescription d'un traitement antibiotique nécessite la certitude ou une forte présomption d'infection bactérienne. Le diagnostic est basé sur une histoire clinique et un examen évocateur (notion de contagé, fièvre aigue, découverte d'une porte d'entrée ou d'un foyer infectieux).

Avant de débuter l'antibiothérapie, il faut évaluer :

- ✓ La gravité de l'infection ;
- ✓ La nécessité et la possibilité des prélèvements bactériologiques, en fonction de la nature du foyer ;
- ✓ La nécessité d'une thérapie d'urgence sans attendre les résultats des cultures ;
- ✓ La nécessité d'une hospitalisation.

On individualise trois types de traitements antibiotiques :

- ✓ Antibiothérapie «probabiliste » ou « empirique » ;
- ✓ Antibiothérapie de l'infection microbiologiquement documentée ;
- ✓ Antibiothérapie prophylactique.

Le clinicien doit privilégier les antibiotiques à spectre étroit par rapport aux antibiotiques à large spectre pour éviter d'exercer une forte pression de sélection sur la flore commensale.

Les buts d'une association sont d'éviter l'émergence de résistance, d'élargir le spectre antibactérien ou d'obtenir une urgence de bactéricidie.

➤ **La délivrance :** l'usage non rationnel et abusif des antibiotiques est consécutif à l'automédication. Cette dernière est due à l'accès facile et à la délivrance sans contrôle des médicaments favorisant une augmentation de la résistance.

➤ **L'administration :** pour espérer un bon traitement, il faut respecter :

- ✓ La dose prescrite ;
- ✓ Les moments des prises ;
- ✓ La durée du traitement ;
- ✓ Les conditions de prise.

## Conclusion

L'apparition des premiers antibiotiques avait suscité un grand espoir quant au traitement des maladies infectieuses notamment dans les infections dites nosocomiales. Cependant, cet espoir a été de courte durée avec l'émergence des phénomènes de résistance développés par les bactéries. Cette résistance bactérienne découle de plusieurs mécanismes tels que la sécrétion d'enzymes qui inactivent les antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactamines avec comme conséquences une restriction du nombre d'antibiotiques choisis en première intention et l'augmentation des échecs thérapeutiques.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris d'effectuer cette étude rétrospective sur l'épidémiologie des souches d'entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées au laboratoire de Bactériologie du CHNU A. Le Dantec entre 2011 et 2013, dans le but de déterminer leur prévalence et leur profil de sensibilité par rapport à diverses familles d'antibiotiques.

Les résultats de cette étude sont les suivants :

- Le taux de prévalence globale des entérobactéries productrices de BLSE au cours de ces trois années est élevé et est de l'ordre de 24,32%. Cette prévalence a baissé de façon significative pour passer de 28,5% en 2011 à 21,5% en 2013 ( $P = 0,019$ ).
- Parmi les souches isolées, *Klebsiellae spp* est la plus représentée avec un taux de 42% dont 92,4% sont des *K. pneumoniae* suivie d'*E. coli* (34,9%) et d'*Enterobacter spp* (18%).
- La médiane d'âge des patients infectés par les entérobactéries sécrétrices de BLSE était de 40 ans [20-60].
- Les entérobactéries sécrétrices de BLSE ont été le plus souvent hébergées chez l'homme avec un taux de prévalence de 54,3%.

- La majorité des entérobactéries productrices de BLSE ont été isolées en milieu hospitalier avec un taux de 67%.
- La majeure partie des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE ont été isolées dans les unités de soins intensifs (38,6%).
- Les entérobactéries sécrétrices de BLSE provenaient principalement des prélèvements d'urines (53,1%) et de pus (26,8%).
- Toutes les souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE étaient résistantes aux aminopénicillines (amoxicilline), aux carboxypénicillines (ticarcilline), aux ureïdopénicillines (pipéracilline), aux C1G (céfalotine) et aux C2G (céfamandole). Ces bactéries ont également développé des taux importants de résistance vis-à-vis de l'association acide clavulanique/amoxicilline (69,6%) et des autres bêta-lactamines telles que l'aztréonam (75,1%), aux céphamycines (céfoxidine 56% ; cefixime 93,2%), aux C3G (céfotaxime ou ceftriaxone 94,3% ; ceftazidime 83,3%). En outre, la majorité des souches avait associé une résistance au complexe sulfaméthoxazole/triméthoprime (88,7%), à la ciprofloxacine (76,8%), à la gentamicine (69,1%), et à la tétracycline (62,2%). Par contre, la fosfomycine, l'amikacine et à un degré moindre le chloramphénicol ont conservé une bonne activité sur ces souches, avec respectivement 93,5%, 89,9% et 67,3% de taux d'efficacité. Il est intéressant de noter dans cette étude que les entérobactéries sécrétrices de BLSE demeurent très sensibles à l'imipénème (excepté une souche).

L'extrême plasticité de la résistance aux antibiotiques, oblige aujourd'hui le microbiologiste à détecter l'émergence de souches résistantes voire multirésistantes aux antibiotiques notamment les entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

Pour contenir l'étendu de ces bactéries multi-résistantes, il semble urgent de mettre au point une politique basée sur un certain nombre de mesures à savoir :

- ☞ Une surveillance continue de la résistance bactérienne aux antibiotiques, notamment par la détection des BLSE sur les souches isolées à partir des unités de soins intensifs et des patients à haut risque ;
- ☞ Une politique de l'utilisation des antibiotiques pour lutter contre l'automédication abusive et les monothérapies notamment par les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération susceptibles de sélectionner des souches sécrétrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu ;
- ☞ La mise en œuvre de mesures d'asepsie et de stérilité au niveau des structures hospitalières pour lutter contre les infections nosocomiales favorables au développement des souches multi-résistantes. On insistera sur le lavage antiseptique des mains et le port de gants à usage unique et d'une sur blouse lors de tout contact ou soin potentiellement contaminant.

## Bibliographie

- 1. Aibinu IE, Ohaegbulam VC, Adenipekun EA, Ogunsola FT, Odugbemi TO, MEE BJ.** Extended-spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):2197-200.
- 2. Ang J.Y, Ezike E, Asmar BL.** Antibacterial resistance. *Indian J.Pediatr.* 2004; 71:229-39.
- 3. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al.** Scientific Committee of ONERBA, Nationwide survey of extended-spectrum-beta-lacta-mase-producing *Enterobacteriaceae* in French community setting. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(6):1205-14.
- 4. Avril J.L, Dabernat H, Denis F, Monteil H.** Bactériologie clinique, Ellipses, Paris, 2000, 2<sup>ème</sup> édition : 171-77.
- 5. Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwarrtz D, Giladi M, Chmelnitsky I et al.** Influx of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 42(7):925-34.
- 6. Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1):1-14.
- 7. Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):933-51.

- 8. Camara M, Faye A, Diop-Ndiaye H, Ba-Diallo A, Karam F, Diop-Diop M, et al.** Epidémiologie des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi dans un hôpital universitaire au Sénégal, 2011. CAMES-série A 2013 (under review).
- 9. Cambau E, Lascols C, Sougakoff W, Bébéal C, Bonnet R, Cavallo JD, et al.** Occurrence of *qnr A* –positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. Clin Microbiol Infect 2006; 12(10):1013-20.
- 10. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM.** Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1):144-53.
- 11. Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela M, Del Carmen, Pérez-Díaz JC, and Baquero F.** Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12 year period. Clin Microbiol 2002; 40(4):1237-43.
- 12. Collégiale de Bactériologie-Virologie-Hygiène.** Bactéries Multirésistantes à l’Assistance Publique –Hôpitaux de Paris. Données 2008. Evolution 1993-2008.
- 13. Conterno LO, Shymanski J, Ramotar K, Toye B, Znovar R, Roth V.** Impact and cost of infection control measures to reduce nosocomial transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in a non-outbreak setting. J Hosp Infect. 2007; 65(4):354-60.

- 14. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW.** Occurrence of extended-spectrum and *AmpC* beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 *AmpC* beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2):772-7.
- 15. Dioman SA.** Epidémiologie des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi au CHU du point G. Thèse pharm. Bamako, 2008.
- 16. Du B, Long Y, Lui H, Chen D, Lui D, Xu Y, Xie Y.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiellae pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive care Med* 2002; 28(12):1718-23.
- 17. Dune EF, Fey PD, Kludt P, Reporter R, Mostashari F, Shillam P, et al.** Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with *Amp C* beta-lactamases. *JAMA* 2000; 284(24): 3151-6.
- 18. Eksi F, Ozer G, Balci I.** Investigation of the frequency of extended-spectrum beta-lactamases and antibiotic resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella sp.* *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(3):445-7.
- 19. Eveillard M, Biendo M, Canarelli B, Daoudi F, Laurans G, Rousseau F et al.** Diffusion des entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi et évolution de leur incidence sur une période de 16 mois dans un centre hospitalier universitaire. *Pathol Biol* 2001; 49(7):515-21.

- 20. Faye I.** Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de souches bactériennes isolées à Dakar : Intérêt de la technique E-test et du programme Whonet III.  
Thèse pharm. Dakar, 1997, N° 07.
- 21. Garnier B et Jarlier V.** Bêta-lactamines et bacilles à Gram négatif.  
Feuilles de biologie, 1996, XXXVII, (212) :13-20.
- 22. Gniadkowski M.** Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1):11-32.
- 23. Goldstein FW.** Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community acquired urinary tract infections in France.  
Multicentre Study Group. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(2): 112-7.
- 24. Harris AD, Mc Gregor JC, Furuno JP.** What infection control interventions should be undertaken to control multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Clin Infect Dis. 2006; 43(suppl 2):S57-61.
- 25. Hawkey PM.** Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (suppl 1):159-65.
- 26. Jacoby GA, Munoz-Price LS.** The new  $\beta$ -lactamases. N Engl J Med 2005; 352(4):380-91.

- 27. Jarlier V, Carbonne A, Astagneau P, Coignard B.** Cas groupés d'infection à *Klebsiella pneumoniae* résistantes à toutes les bêta-lactamines y compris à l'imipénème en région parisienne. Edition InVS, 2003, p. 84.
- 28. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A.** De l'antibiogramme à la prescription. Ed Biomérieux 2<sup>ème</sup> Ed. 2003 : 22p.
- 29. Kader AA, Kumar A, Kamath KA.** Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients and asymptomatic healthy individuals. Infect Control Hosp Epidemiol 2007; 28(9):1114-6.
- 30. Kaltenbach G, Heitz D, Vogel T, Nobel M, Martin-Huny, ADI M, et al.** Prevalence of wide spectrum beta-lactamase producing enterobacterial urinary infection medicine. Presse Med 2002; 31(26):1213-17.
- 31. Karim A, Poirel L, Nagarajan S and Nordmann P.** Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M 3 like) from India and gene associated with insertion sequence IS<sub>Ecp1</sub>. FEMS Microbiol Lett 2001; 201(2):237-41.
- 32. Kola A, Holst M, Chaberny IF, Ziesing S, Suerbaum S, Gasrmeier P.** Surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period. J Hosp Infect. 2007; 66(1):46-51.

- 33. Lagacé-Wiens PRS, Nichol KA, Nicolle LE, DeCorby M, McCracken M, Alfa MJ, et al.** ESBL genotypes in fluoroquinolone-resistant and fluoroquinolone-susceptible ESBL-producing *Escherichia coli* urinary isolates in Manitoba. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2007; 18(2):133-7.
- 34. Lavigne JP, Bonziges N, Chanale C, Mahamal A, Michaux-charachon S, sotto A.** Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing Extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8):3805-08.
- 35. Le Minor L, Veron M.** Bactériologie médicale. 2éme éd. Médecine Science Flammarion, Paris, 1990; 389-472.
- 36. Livermore DM.** Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1):3-10.
- 37. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al.** CTX-M: changing the face of ESBL in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2):165-74.
- 38. Li XZ.** Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(6):453-63.
- 39. Lucet JC, Paoletti X, Lolom I, Paugam-Burtz C, Trouillet JL, Timsit JF, et al.** Successful long-term program for controlling methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2005; 31(8):1051-7.

**40. Mirabaud M.I.** Entérobactéries à bêta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996.

Thèse pharm. Genève, 2003, N° 10303.

**41. Morosini MA, Garcia-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, et al.** Antibiotic coresistance in Extended-Spectrum-b-

Lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of Tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(8):2695–9.

**42. Mouna B.** Etude épidémiologique et méthodes de détection de souches d'entérobactéries productrices de BLSE au CHU Ibn Rochd de Casablanca (Maroc).

Thèse pharm. Casablanca, 2005, N° 28.

**43. Moustoui N, Soukri A, El mdaghri N, Boudouma M, Benbachir M.**

Molecular biology of extended-spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae* responsible for digestive tract colonisation. *J hosp Infect* 2004; 57(3):202-8.

**44. Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.

*Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1):42-52.

**45. National Committee on Clinical Laboratory Standards.** Approved

standard M2-14 : performances standard for antimicrobial susceptibility tests (normes de performances des tests de sensibilité anti-microbiennes. 4<sup>th</sup> Ed., Villa nova, PA : NCCLS, 1990.

**46. Ndiaye AOK.** Les entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre élargi.

Thèse pharm. Dakar, 2005, N° 37.

**47. Neu HC.** Définition et classification des bêta-lactamases. Med Mal Infect 1998 ; (hors série) : 7-10.

**48. Niandou MT.** Sensibilité et évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques.

Thèse Pharm, Bamako, 2005.

**49. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM et al.** Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25: H4-ST 141 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother 2008; 61(12):273-81.

**50. Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V.** La Collégiale de bactériologie-virologie hygiène hospitalière de l'Assistance publique-Hôpitaux de Paris, France. Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. Clin Microbiol Infect 2008; 14(Suppl. 1):111-6.

**51. Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V.** Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (suppl 1):111-6.

**52. Oteo J, Campos J, Baquero F.** Antibiotic resistance in 1962 invasives isolates of *E.coli* in 27 Spanish hospitals participating en the European

antimicrobial resistance surveillance system (2001). J Antimicrob Chemother 2002; 50(6):945-52.

**53. Paterson D.** Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Med 2006; 119(6 Suppl. 1):S20-8 (discussion S62-70).

**54. PATERSON DL.** Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). Clin Microbiol Infect 2000; 6(9):460-3.

**55. Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18(4):657-86.

**56. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB et al.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M-type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(11):3554-60.

**57. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A, Mohapatra S, Cassellas JM, Gossens H, et al.** International prospective study of *Klebsiella pneumonia* bacteremia: implications of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase productions in nosocomial infections. Ann Intern Med 2004; 140(1):26-32.

**58. Paterson DL, Mulazimoglu, Cassellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, et al.** Epidemiology of ciprofloxacin resistance audits relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *K.*

*pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis 2000; 30(3):473-8.

- 59. Pereira LMP, Phillips M, Ramlal HTK, Prabhakar P.** Third generation cephalosporin use in a tertiary hospital in port of Spain, Trinidad: Need of an antibiotic policy. BMC Infect Dis 2004; 4(1):59.
- 60. Pitout JD, Laupland KB.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 2008; 8(3):159-66.
- 61. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L.** Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum-beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother 2005; 56(1):52-9.
- 62. Ploy MC, Denis F, Lamberi T.** Les intégrrons: un système original de capture de gènes chez les bactéries. Med /Sci 2000; 16(2):255-9.
- 63. Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Genetic support of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1):75-81.
- 64. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Conto E, Gutkind G, and the microbiology study group.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(9):2864-67.

- 65. Rolison GN.** Forty of beta-lactam research. *J. Antimicrob Chemother* 1998; 41(6):589-603.
- 66. Sabine RD.** Principales familles d'agents chimiothérapeutiques, antibiotiques, antibiogrammes. Décaires, 1995, Paris : 37-53.
- 67. Schorderet M. et coll.** Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 3<sup>ème</sup> édition Frisson-Roche, Paris, 1998. p.739.
- 68. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y.** High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(5):2137-9.
- 69. Slama TG.** Gram negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 2008; 12(4): S4.
- 70. Sturenburg E, Dietrich M.** Extended-spectrum beta-lactamases implication for the clinical microbiology, therapy, and infection control. *J Infect* 2003; 47(4):273-95.
- 71. Sy KR.** Souches bactériennes et résistance aux antibiotiques. Données actuelles au CHU A. Le DANTEC de Dakar. Thèse Pharm., Dakar, 1996, N° 55.
- 72. Tigaud S.** Quoi de neuf en matière de résistance aux antibiotiques. *Biotribune* 2004 ; N°10 : V, VI.

- 73. Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R.** Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during non-outbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4769-75.
- 74. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.** Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(8):2385-92.
- 75. Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr A*, *qnr B*, and *qnr S* among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(4):1223-7.
- 76. Younes A, Hamouda A, Dave J, Amyes SG.** Prevalence of transferable *blaCTX-M-15* from hospital- and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* isolates in Scotland. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(2):313-8.
- 77.** [http://www.cclinparisnord/BMR/2007/Rapport\\_BMR2007.pdf](http://www.cclinparisnord/BMR/2007/Rapport_BMR2007.pdf). Consulté le 22/07/2013.