

République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

Université Badji Mokhtar-Annaba



Facultés des sciences

Département de Biochimie

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Microbiologie

Option : MICROBIOLGIE APPLIQUEE

Thème

***ETUDE FREQUENTIELLE DES BACTERIES RESPONSABLES DES
INFECTIONS SEPTICEMIQUES CHEZ LES ENFANTS DANS LA
REGION D'ANNABA***

Présentée par : ASMA LABID

Devant le jury :

Directrice de thèse:	Pr.Djamila GACEMI- KIRANE	Université d'Annaba
Présidente :	MCA.Houria CHETTIBI	Université d'Annaba
Examineur:	Pr. Rachid OUZROUT	Université d'EL TARF
Examineur :	MCA. Tarek MERAD	Université d'Annaba
Examinatrice:	Pr. Leila AOUN	Université d'EL TARF

Année universitaire : 2014-2015

Jamais cette thèse n'aurait vu le jour

Sans l'amour et l'affection

Que j'ai pu trouver au sein de ma famille ...

REMERCIEMENTS

La rédaction de ce manuscrit venant clore l'aventure que constitue une thèse, je tiens donc à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont joué un rôle dans sa concrétisation

En premier lieu je tiens à remercier :

*Dieu le tout puissant « **EL HAMDOUN WA CHOUKROU LI ALLAH** » qui m'a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.*

*Je tiens à remercier tout d'abord mon encadreur le professeur **GACEMI-KIRANE DJAMILA**, une grande dame qui a beaucoup de mérite dans ce que je viens d'accomplir qui m'a enseigné la rigueur scientifique. Je la remercie pour son aide précieuse et les conseils qu'elle m'a prodigués tout au long de mon parcours difficile de doctorat et pour la confiance qu'elle m'a témoignée.*

La clarté et la précision de son rapport montrent à quel point elle s'est investie dans ce manuscrit. Ses critiques et ces conseils me sont très précieux.

Monsieur le professeur Jean Marc Rolain pour m'avoir donné la chance de relayer une grande partie de ma thèse dans son unité de recherche.

Monsieur le professeur Mazouz Dekhil, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire à l'hôpital DORBAN, ce qui m'a permis de réaliser une partie de mon travail.

***Mme Houria Chettibi**, Maître de conférences de Classe A à l'université de Annaba qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury d'examen de cette thèse.*

J'adresse mes remerciements à Mesdames et Messieurs :

***Mme DJAGHRI BAIDA**, Professeur à E.N.S.S.M.A.L, qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.*

***Mr OUZROUT REDHA** , Professeur à l'Université d'EL TARF, qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.*

***Mr MERAD TAREK** , Maître de conférence de Classe A à l'université de Annaba, qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.*

Mme AOUN LEILA Professeur à l'Université d'EL TARF, qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner :

***Mes parents :** pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour leur confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux. Ils m'ont offert la possibilité de réaliser mon rêve. Ils ont toujours témoigné de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions. Malgré toutes les difficultés rencontrées au cours de ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de leur rendre tout ce qu'ils m'ont offert. Rien n'aurait été possible sans eux, cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout la leur.*

Aucun remerciement ne serait suffisant.

A mon frère MEHDI et ma belle sœur ZAHRA

Sans oublier la petite GANGAN qui illumine nos jours que dieu te protège

A ma sœur YOUSRA pour sa patience et son aide dans mes moments difficiles.

Je remercie celle que je considère comme ma deuxième maman Mme Houioua une grande dame qui a beaucoup de mérite dans ce que je viens d'accomplir.

Et enfin, mes plus grands remerciements vont à la lumière de ma vie. Mon merveilleux futur époux qui embellit ma vie chaque jour, pour son soutien quotidien, son optimisme persistant dans la joie et parfois dans la mauvaise humeur.

Pour ses encouragements et son assistance morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, Merci à toi.

Je remercie enfin tous ceux qui m'ont encouragé et soutenu par leur amitié.

« Toute avancée des connaissances génère autant d'interrogations qu'elle apporte de réponse. »

Pierre Joliot

La résistance aux antibiotiques est clairement apparue il ya soixante ans avec le staphylocoque producteur de pénicillinase. Dans les années cinquante, la recherche industrielle, à partir des sources naturelles aboutit à une floraison d'agents antimicrobiens si nombreux que l'on peut en faire un dictionnaire touffu. Mais l'antibiothérapie évolua vers la mise au point de dérivés avec un succès considérable en matière d'activité et généralité. L'histoire de la résistance montre clairement qu'aujourd'hui de très nombreux mécanismes affectent tous ces dérivés et des échecs thérapeutiques graves leur sont imputables. Devant cette situation, on peut certes en réduire les conséquences par un meilleur choix, mais en droit s'il ne faut pas recommencer à interroger la nature, autrefois si proluxe, pour lui demander de fournir de nouvelles bases pour une nouvelle ère antibiotique

Docteur Yves A Chabbert

*« ... un mauvais usage de la substance aboutirait à ce que, au lieu d'éliminer l'infection, on apprenne aux microbes à résister à la pénicilline et à ce que ces microbes soient transmis d'un individu à l'autre jusqu'à ce qu'ils en atteignent un chez qui ils provoqueraient une pneumonie ou une septicémie que la pénicilline ne pourrait guérir... »
(Fleming, 1945)*

Sommaire

Sommaire	1
Liste des figures	8
Liste des Tableaux.....	10
Lise des abréviations	11
<i>INTRODUCTION</i>	15
<i>PARTIE 1 :REVUE DE LA LITTERATURE</i>	21
Chapitre 1 :l'infection bactérienne (Bryce et al;2005)	22
1. Comment apprécier la sévérité du sepsis? (Caille et al, 2004; Burn Buisson, 2000)....	23
2. Bases théoriques des scores de gravité	23
3. Objectifs des scores de gravité	24
4. Recherche d'exactitude.....	24
1. Introduction.....	25
2.1. Rappels cliniques	26
2.2. Hémoculture	26
2.2.1. Définition.....	26
2.2.2.1. Faible densité bactérienne	27
2.2.2.2. Vitalité bactérienne	27
2.2.2.3. Milieux d'hémoculture	28
2.2.4.1. Détection manuelle	30

2.2.5.1. Cocci à Gram Positif :	33
2.2.5.2. Cocci à Gram négatif :.....	33
2.2.5.3. Bacilles à Gram Négatif.....	34
1. Généralités sur les Entérobactéries	34
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
1.2. <i>Enterobacter cloacae</i>	36
1.3. <i>Escherichia coli</i>	36
1.4. <i>Serratia marcescens</i>	36
Chapitre 3 : Les β-lactamines.....	37
1. Définition	37
1.1. Les pénicillines (Ferres and Nunn, 1983).....	38
1.2. Les céphalosporines (Allain P, 2008)	38
1.3. Les carbapénèmes	39
1.4. Les Monobactames (Jean-Louis Pourriat, 2005).....	40
1.5. Les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactame, sulbactame) .	40
Chapitre 4 : La résistance bactérienne (Yvon Michel-Briand, 2009).....	40
1. Résistance naturelle	40
2. Résistance acquise (Yvon Michel-Briand, 2012)	41
3. Supports génétiques de la résistance (EARS-Net, 2011).	41
3.1. Le chromosome (Steven et al, 2013)	42
3.1.1. Résistance naturelle	42
3.1.2. Résistance acquise	42
3.2. Les éléments génétiques mobiles	42

3.2.1.	Les plasmides (Snyder et al, 2013)	42
3.2.2.	Séquences d'insertion et transposons (Prescott et al, 2003).....	42
3.2.3.	Les intégrons	43
4.	Mécanismes de la résistance (Yvon Michel-Briand, 2012)	43
4.1.	Désarmement.....	44
4.2.	Blindage.....	44
4.2.1.	La diminution de perméabilité.....	44
4.2.2.	Efflux actif (Quale et al., 2006)	45
4.3.	Camouflage.....	46
4.4.	L'induction de résistance (Yvon Michel-Briand, 2009)	46
5.	Le cas des β-lactamines.....	46
5.1.	Modification des protéines de liaison a la pénicilline (PLP)	46
5.2.	Systèmes d'efflux actif.....	46
	Chapitre 5 : Les β-lactamases	47
1.	Historiques sur les β-lactamases	47
2.	Production de β-lactamases.....	47
2.1.	Classification des β -lactamases	48
2.1.1.	La classification de Ambler.....	48
2.1.2.	La classification fonctionnelle de Bush et Jacoby	49
2.1.3.	Classification de Richmond-Sykes	50
3.	Réaction enzymatique.....	50
4.	Structure protéique des β-lactamases à sérine active	51
5.	Les β-lactamases à Spectre Elargi (BLSE)	51
5.1.	Détection des BLSE par les Techniques microbiologiques.....	52

5.1.1.	Test de double synergie (Jarlier et al., 1988)	52
5.1.2.	Interprétation de la faible diminution de la sensibilité.....	53
5.1.3.	Test de trois dimensions (Thomson and Sanders, 1992).....	53
5.1.4.	L'utilisation du disque de cefpodoxine (30 ug)	53
5.1.5.	L'utilisation des disques de ceftazidim de 5ug.....	53
5.1.6.	L'utilisation de la méthode des disques (CLSI 2010).....	53
5.1.7.	Les bandelttes E-test	54
5.1.8.	Le test de Vitek.....	54
5.2.	Techniques moléculaires	54
5.3.	Classification phylogénétique des BLSE.....	56
5.4.	Diversité des types de BLSE.....	57
5.4.1.	Les BLSE de type TEM et SHV	57
5.4.2.	Les BLSE de type CTX-M	61
5.4.2.1.	Spectre d'activité et classification des BLSE de type CTX-M.....	61
5.4.2.2.	Distribution géographique des BLSE de type CTX-M.....	63
5.4.2.3.	Support génétique et origine des BLSE de type CTX-M.....	65
5.5.	Epidémiologie des BLSE.....	65
6.	Les carbapénémases.....	66
Chapitre 6 : Infections causées par les BLSE		67
1.	Définition des syndromes septiques.....	67
2.	Epidémiologie des syndromes septiques	69
2.1.	Incidence.....	69
2.2.	Mortalité et morbidité	69
2.3.	Facteurs de risque	70
2.3.1.	Age.....	70

2.3.2.	Sexe.....	72
2.3.3.	Etiologie.....	73
2.4.	Diagnostic des syndromes septiques.....	74
<i>PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES</i>		75
1.	Préambule et objectifs	76
2.	Catégorie des patients (Michel VAUBOURDOLLE, 2007)	77
3.	Techniques de prélèvement (Michel VAUBOURDOLLE, 2007)	77
4.	Acheminement au laboratoire (BARRAUK et al, 2004).	78
4.1.	Suivi des flacons d'hémoculture (SNYDER JW et al, 2001).....	78
5.	Méthodes d'analyses	79
5.1.	Ensemencement par la méthode de râteau	79
5.2.	Recherche des entérobactéries	79
5.2.1.	Coloration de Gram	79
5.2.2.	Identification biochimique	80
5.2.2.1.	Identification par galerie biochimique API 20E	80
5.2.3.	Identification par spectrométrie de masse (MALDI=Matrix- Assisted Laser Desorption/ Ionisation (Seng et al., 2009)	82
5.3.	Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu solide.....	84
5.3.1.	Préparation de l'inoculum	84
5.3.2.	Lecture des boîtes après incubation.....	85
5.4.	Détermination de la CMI en milieu solide (CASFM, 2010)	88
5.4.1.	Principe	88
5.4.2.	Technique.....	88
5.5.	La détection phénotypique des BLSE.....	89
5.5.1.	Test de Synergie	89

5.5.2.	Test à la cloxacilline (De Champs et al., 2002) , (Naas, 2003)	89
5.5.2.1.	Principe	89
5.5.2.2.	Technique	90
5.5.2.3.	Lecture	90
5.5.3.	Test du double disque (test espagnol)	91
5.6.	Recherche moléculaire des BLSE	91
5.6.1.	Polymérase Chaîne Réaction (PCR standard)	92
5.6.1.1.	Extraction de l'ADN.....	92
5.6.1.2.	Protocole d'une PCR standard	93
5.6.2.	Electrophorèse sur gel d'agarose	96
5.6.2.1.	Protocole de préparation du gel d'agarose	96
5.6.2.2.	Electrophorèse des produits d'amplification	96
5.6.2.3.	Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV.....	96
5.6.3.1.	Purification.....	97
5.6.3.2.	PCR Big Dye.....	97
5.6.3.3.	Purification par gel séphadex.....	98
5.6.3.4.	Méthode du séquençage	98
5.6.3.4.1.	Analyse des séquences	98
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION		100
1.	Identification et origine des souches.....	101
1.1.	Répartition des souches selon l'âge.....	106
1.1.1.	<i>Cas de Klebsiella pneumoniae, d'Enterobacter cloacae, Escherichia coli et Serratia marcescens</i> 106	
1.2.	Répartition des souches selon le sexe.....	106
1.2.1.	Cas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	106
1.2.2.	Cas d' <i>Enterobacter cloacae, Escherichia coli et Serratia marcescens</i>	107

1.3. Répartition des souches selon la mortalité.....	108
1.3.1. Cas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	108
1.3.2. Cas d' <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i>	108
1.4. Répartition des souches selon les pathologies causales	109
1.4.1. Cas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	109
1.4.2. Cas de d' <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i>	110
2. Sensibilité des souches aux antibiotiques.....	111
2.1. Cas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	111
2.2. Cas d' <i>Enterobacter cloacae</i>	112
2.3. Cas d' <i>Escherichia coli</i>	113
2.4. Cas de <i>Serratia marcescens</i>	114
3. Phénotype de résistance.....	115
3.1. Production de BLSE chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	115
3.2. Production de BLSE chez d' <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i>	116
4. Profil moléculaire des souches isolées	116
4.1. Cas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	116
4.2. Cas d' <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , et <i>Serratia marcescens</i>	119
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	134
RESUME	138
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	142

Liste des figures

Figure 1. Cycle β -lactame (Bonnet R, 2006).....	37
Figure 2. Enveloppe d' <i>Escherichia coli</i> (Alpha Amadou DIALLO, 2013).....	45
Figure 3. Images de synergie (Laurence Drieux, 2012).	52
Figure 4. Classification phylogénétique des BLSE D'après (Arlet G, 2006).	56
Figure 5. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type TEM (Bradford,2001). *variant pénicillinase ; **variant TRI.....	59
Figure 6. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type SHV.....	60
Figure 7. Schéma de l'arbre phylogénétique des CTX-M : Origine des gènes codant le groupe CTX-M (Arlet G, 2006).	62
Figure 8. Répartition mondiale des différentes BLSE de type CTX-M.....	64
Figure 9. Taux de mortalité des états septiques en fonction du stade de sévérité aux Etats-Unis (Wenzel, 2002).	70
Figure 10. Incidence de la septicémie bactérienne d'après l'âge ; (Watson et al., 2003).	71
Figure 11. Incidence du sepsis entre 1979 et 2000 aux Etats-Unis en fonction du sexe des patients (Martin et al., 2003).	72
Figure 12. Nombre de cas de sepsis aux Etats-Unis en fonction des microorganismes responsables entre 1979 et 2001 (Finfer et al., 2004).	73
Figure 13. Photo de la galerie API 20 E avec sa fiche d'identification pour se référer au logiciel.....	81
Figure 14. Schéma général de l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS.....	84
Figure 15. Test de synergie positif (aspect en bouchon de champagne).....	89
Figure 16. Méthode à la cloxacilline (image de synergie positive).....	90
Figure 17. Photo montrant une image de synergie.....	91
Figure 18. Exemple d'un gène CTX-M corrigé et comparé à une séquence homologue de « Gene bank » qui présente une similitude à 100%	99
Figure 19. Répartition des souches selon l'âge chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i>	106
Figure 20. Répartition des souches selon le sexe chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	106
Figure 21. Répartition des souches selon le sexe chez <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , et <i>Serratia marcescens</i>	107
Figure 22. Répartition de souches selon la mortalité chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	108

Figure 23. Répartition de souches selon la mortalité chez <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , et <i>Serratia marcescens</i> .	108
Figure 24. Répartition de souches selon les motifs d'hospitalisation chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	109
Figure 25. Répartition de souches selon les motifs d'hospitalisation chez <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i> .	110
Figure 26. Profil de résistance aux antibiotiques des souches <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrices de BLSE isolées d'hémoculture.	111
Figure 27. Profil de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>Enterobacter cloacae</i> , productrices de BLSE isolées d'hémoculture	112
Figure 28. Profil de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>Escherichia coli</i> productrices de BLSE isolées d'hémoculture	113
Figure 29. Profil de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Serratia marcescens</i> productrices de BLSE isolées d'hémoculture	114
Figure 30. Répartition de souches selon le phénotype de BLSE chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	115
Figure 31. Répartition de souches selon le phénotype de BLSE chez <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i> .	116
Figure 32. Représentation de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène blaCTX-M des 42 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i> .	121
Figure 33. Représentation de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène blaTEM des 42 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i> .	122
Figure 34. Représentation de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène blaSHV des 42 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Serratia marcescens</i>	123

Liste des Tableaux

Tableau 1. Définition des syndromes septiques selon la réunion d’experts de l’ACCP/SCCM (Bone et al., 1992).	68
Tableau 2. Volume de sang à mettre en culture chez l’enfant (BARRAUK et al, 2004).	78
Tableau 3. Diamètre critique des différents antibiotiques utilisés (CA-SFM 2010).....	87
Tableau 4. Composition des mélanges réactionnels pour la PCR standard	93
Tableau 5. Amorces utilisées pour PCR standard.....	95
Tableau 6. Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big-dye	97
Tableau 7. Programme de l’amplification de la PCR Big Dye	98
Tableau 8. Traduction des profils numériques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en caractères biochimiques	102
Tableau 9. Traduction des profils numériques d’ <i>Enterobacter cloacae</i> en caractères biochimiques	103
Tableau 10. Traduction des profils numériques de <i>Serratia marcescens</i> en caractères biochimiques	104
Tableau 11. Traduction des profils numériques d’ <i>Escherichia coli</i> en caractères biochimiques	105
Tableau 12. Caractérisation des isolats cliniques des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> issus d’hémoculture.....	118
Tableau 13. Caractérisation des isolats cliniques des souches de <i>E. cloacae</i> , <i>E coli</i> et <i>S marcescens</i> issus de prélèvement sanguins	120

Lise des abréviations

AAC : Aminoglycoside acetyltransférases

AARN : Réseau National de Surveillance de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

ACT : Gène codant pour une céphalosporinase

AmpC : Bétalactamases chromosomique

API 20E : Analytical profile index 20E(Enterobactéries)

ARA : Arabinose

Arm : Amino glycoside resistance methylasex

ARNr: Acide ribonucleique ribosomique

Azi R : Résistant l'azide

BES : Brazilian Extended Spectrum(une betalactamae à spectre étendu)

BET : Bromure d'éhidium

BGN : Bactérie à Gram Négatif

BLAST N : Basic Local Alignment tool Nucléotide

BLAST P : Basic Local Alignment tool Proteine

BLAST: Basic Alignment tool

BMR : Bactérie muti-résistante

ACCP/SCCM: Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.

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

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMY : Cephamycinase (gène codant pour une céphalosporinase plasmidique)

CTX-M : Céfotaxime Munich

EARS-NET : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

EMB: Eosine bleu de méthylène

EUCAST: European comity on antibiotic susceptibility testing

F: Forward

FIO₂ : fraction d'oxygène dans l'air expire

GES : Guyana extended spectrum (une bêta-lactamases à spectre étendu)

H₂O UP : Eau Ultra Pure

HCCA : Acide α -cyano 4-hydroxycinanamique

IS : Insertion Sequence

Kb : Kilo-bases

Kp BLSE : *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE

Kpb : Kilo-paire de base

L : Litre

LPS: lipopolysaccharide

M : Marqueur

MALDI-TOF: (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionisation TOF :time of flight)

Spectrometry

MBL: Métallo- β -lactamase

MS : Microflex

NCBI : Genome database of the National Center for Biotechnology Information

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONPG : l'orthonitrophényl- β -galactosidase

PA : pression artérielle

PaCO₂ : pression partielle artérielle en CO₂

Pb : Paires de bases

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PER : *Pseudomonas* extended resistance

PLPs : Protéine de liaison à la pénicilline

PSM : Poste de sécurité Microbiologique

R: Reverse (inverse)

RNA : Ribonucleic Acid

Rpm: Rotation par minute

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SHV : sulfhydryl variable

SIRS : Syndrome Inflammatoire de Réponse Systémique

ST :Sequence type

SXT : Sulfamide+ Triméthoprime

TBE :Tri-Borate-EDTA

TFA : Acide TriF-4-fluorcétique

VEB : Vietnam extended spectrum (une bétalactamse à spectre étendu)

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques, notamment la pénicilline en 1928 a sans doute été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle. L'utilisation de ces antibiotiques depuis les années 1940 a considérablement réduit le taux de morbidité et de mortalité lié aux maladies infectieuses. Cependant, leur utilisation à grande échelle a également conduit à l'émergence de la résistance aux antibiotiques. Les premières bactéries résistantes ont été identifiées dès les années 1940, avec notamment l'émergence de *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline dès 1947, soit seulement quatre ans après l'utilisation à grande échelle de cet antibiotique. **(Yvon Michel-Briand 2009).**

A partir des années 1950, de nombreux antibiotiques ont été découverts ou synthétisés et pour chaque nouvelle classe développée, nous avons assisté par la suite à l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance, entraînant la diffusion de bactéries pathogènes de plus en plus difficiles à traiter, comme ce fut le cas de la méticilline G, mise sur le marché en 1961 suivi de la découverte de *S. aureus* résistants en 1962; de l'ampicilline G en 1962 suivi de l'émergence d'Entérobactéries résistantes en 1964; puis des céphalosporines mise sur le marché en 1980 suivi de l'émergence d'entérobactéries résistantes en 1981, principalement les betalactamases (BLSE) **(Yvon Michel-Briand 2009).**

Les β -lactamases à spectre élargi ou BLSE sont des enzymes produites par les bacilles à Gram-négatif possédant un spectre de substrat large qui comprend les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème et de 3ème génération ainsi que l'aztréoname, mais qui épargne les céphamycines et les carbapénèmes. Les entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) ont été rapportées dès les années 1980 en Europe. **(Rawat and Nair, 2010); (Nicolas et al., 1987) ;(Ghafourian et al., 2014).**

Découvertes pour la première fois chez *Klebsiella ozaniae* en République Fédérale d'Allemagne en 1983 **(Michael R. Mulvey, et al, 2004)** puis en 1984 chez *K.pneumoniae* et *Escherichia coli* en France et en Tunisie **(Kliebe et al, 1985 ;Knothe et al, 1983)** à l'origine, la majorité des BLSE détectées dérivait des pénicillinases TEM-1, TEM-2 et SHV-1 par mutation ponctuelle mais depuis 1995, de nouvelles BLSE comme les enzymes de type CTX-M ou encore PER, GES et VEB ont émergé (**Paterson DL, Bonomo RA,2008**) A ce jour, plus de 600 variantes de BLSE ont été décrites à travers le monde représentant un problème majeur de santé publique **(Geser et al., 2012).**

En fonction de leur séquence en acides aminés, ces enzymes ont été classées dans 11 familles différentes.

Les tests phénotypiques permettent de manière présomptive d'identifier la présence de BLSE. Pour connaître le type de BLSE que produisent les souches cliniques, il faut avoir recours aux techniques moléculaires qui sont assez complexes et laborieuses. Ces techniques requièrent des personnes hautement qualifiées et un laboratoire bien équipé. Elles ne sont pas facilement réalisables en routine surtout dans les pays en développement. Ces techniques ont le mérite d'être spécifiques et permettent de connaître la type de BLSE produit par les isolats cliniques. Plusieurs de ces techniques sont utilisées entre autre ; l'utilisation des sondes d'acides désoxyribonucléiques, la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) avec plusieurs variantes, l'oligotypage, « la Ligase Chain Reaction » et le séquençage des nucléotides (**Bradford, 2001**). Ces techniques en plus de la détection permettent aussi de caractériser les BLSE.

Afin d'acquérir un large spectre de résistance contre une multitude d'antibiotiques, certaines souches expriment différentes β -lactamases, chacune avec une spécificité qui leur est caractéristique. Ainsi, il n'est pas rare que l'identification d'isolats cliniques révèle non seulement la présence d'une β -lactamase chromosomique spécifique à la souche, mais aussi de plusieurs enzymes plasmidique, dont parfois à large spectre d'action (extended-spectrum β -lactamases, BLSE) (**Ambler, 1980**) ; (**Weber et al., 1990**).

D'abord qualifiés de résistance hospitalière, les BLSE sont de plus en plus détectées chez les patients communautaires. Des travaux ont été rapportés en Espagne et Etats-Unis.

Les causes de ces infections ne sont pas encore clarifiées. Toutefois la consommation des produits alimentaires, des animaux ayant consommé les antibiotiques et la fréquentation des patients hospitalisés devrait être explorées (**Vervoort et al., 2012**) ; (**Bradford, 2001**) ; (**Paterson and Bonomo, 2005**).

il ya un manque de données épidémiologiques dans les pays du Maghreb, et très peu d'études sont publiées sur les BLSE chez les entérobactéries (**Bourjilat et al., 2011**) ;(**Lahlaoui et al., 2012**), comparé aux données des régions méditerranéennes, selon EARSS 2009, ces dernières qui sont des hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes) (**CHU-PS, 2003**).

La plupart sont commensales, mais certaines souches possèdent des facteurs de virulence qui leur permettent de déclencher des diarrhées. *Escherichia coli* est une cause majeure de diarrhée aigue dans le monde (**Berche, 2003**). A côté des infections intestinales, elle est responsable d'infections extra-intestinales diverses: urinaires, abdominales, méningées et des

bactériémies. La principale espèce pathogène du genre *Serratia* est *Serratia marcescens* qui provoque habituellement des infections nosocomiales (Avril et al, 2000; Fauchère, 2002).

Les BLSE ont aujourd'hui une répartition mondiale. Leur prévalence varie d'une région à une autre, d'un pays à un autre, d'une ville à une autre et même d'un hôpital à un autre. Ces variations dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquelles la détection de ces enzymes, les mesures de surveillance des maladies infectieuses, l'utilisation abusive des antibiotiques. Les facteurs spécifiques de risque d'acquisition des BLSEs chez les patients hospitalisés sont une longue hospitalisation, la sévérité de la maladie, l'intervention chirurgicale, le séjour au service de soins intensifs, l'intubation la ventilation mécanique et le port des cathéters artériels ou urinaires.(Canoui et al., 2014).

Les enzymes de type CTX-M ont diffusé chez l'espèce *E. coli*, espèce jusqu'alors peu concernée par la production de BLSE.(Rodríguez et al., 2014). Elles sont actuellement les BLSE les plus répandues dans le monde causant des infections nosocomiales de plus en plus grave en particulier en unité de soins intensifs chez les enfants. (Canoui et al., 2014).

Nous nous sommes intéressés dans notre étude aux septicémies pédiatriques car elles continuent à causer une forte proportion de mortalité et de morbidité a long terme au sein de la population ; le sepsis sévère est la première cause de mortalité et de morbidité en unité de soin intensifs et d'après l'organisation mondiale de la santé OMS, c'est la quatrième cause de mortalité chez les enfants. (Pradhan et al., 2012)

En dépit de nombreux essais cliniques et d'une prise en charge adéquate des patients dans les premières heures du choc septique (antibiothérapie, remplissage vasculaire agressif), la mortalité liée aux syndromes septiques reste très élevée. C'est la première cause de mortalité dans les services de soins intensifs. (Sáez-Llorens et al., 1995).

Peu d'étude ont été publiées sur le sepsis dans les pays en voie de développement, les quelques études qui se sont intéressées à la mortalité du sepsis exemple (Sáez-Llorens et al., 1995) du panama ont rapporté un taux de mortalité de 39%, et dans une étude récemment publiée en Tunisie (Menif et al., 2009) ont rapporté que le taux de mortalité de septicémie est de 45,7% dans une autre étude publiée au Pérou (Becerra et al., 2010) le taux de mortalité était de 66,7% , le sepsis atteint 20% dans les pays développés (Pradhan et al., 2012) et plus de 50% dans les pays en développement et est en nette augmentation (Branco et al., 2005) (Khilnani et al., 2010) la mortalité varie de 25 % à 80 % et la septicémie demeure la principale cause de mortalité en soins intensifs (Bossi et al., 2004).

L'hémoculture représente le moyen le plus sûr de reconnaître le germe responsable d'une septicémie, mais elle exige un délai souvent incompatible avec l'urgence de la situation. Les bactéries responsables de septicémie ou de bactériémie sont très variées, et il faut parfois faire preuve d'ingéniosité pour les isoler et les identifier. C'est un examen capital en pathologie infectieuse, mais qui n'est pas toujours praticable dans bon nombre d'hôpitaux africains et le clinicien est souvent contraint de suspecter la bactérie causale afin de définir une attitude thérapeutique. En effet, rares sont les signes de certitude et le médecin raisonne plutôt par arguments de fréquence. Mais il faut se souvenir que 15% environ des hémocultures positives sont des hémocultures qui ont été contaminées lors du prélèvement.

Au cours des septicémies, le nombre de bactéries est souvent très faible. Il s'ensuit que la recherche de bactéries à l'examen direct est inutile, seule une culture est assez sensible pour révéler leur présence ; qu'une quantité assez importante de sang doit être mise en culture si on veut avoir une chance qu'elle contienne au moins une bactérie et que les délais de culture sont parfois longs.

La porte d'entrée du germe causal conditionne, dans une large mesure, le mécanisme de la constitution de l'état septicémique et du choc infectieux et suivant donc le siège initial du germe causal plusieurs types de septicémies sont à noter :

- septicémie thrombose-phlogistique ;
- septicémie à point de départ lymphatique ;
- septicémie par endocardite et artérite.

Devant le problème médical que posent les états septicémiques, l'identification de l'agent causal et la recherche du foyer est une étape essentielle dans la prise en charge des états septicémiques. L'exploration diagnostique en laboratoire, devra être complétée par la recherche des sensibilités aux substances antibactériennes, et la surveillance de l'efficacité thérapeutique, puisque la vraie maladie n'est pas la présence de bactéries dans le sang mais l'existence d'un foyer qu'il faudra stériliser pour guérir le sujet malade.

Les résultats de l'hémoculture en cas de positivité doivent cependant être complétés par l'étude de l'activité des substances antibactériennes en vue d'une antibiothérapie en rapport avec la clinique du patient. La confrontation entre les résultats en laboratoire et la clinique s'avère donc indispensable à toutes les étapes du diagnostic.

Les infections nosocomiales représentent aussi des facteurs de risque de sepsis sévères car survenant sur des malades fragiles. L'existence chez ces malades de sonde urinaire, cathéters veineux et artériel, sonde d'intubation, favorisent de même le développement des infections (**Parrillo et al., 1990**) et des facteurs propres aux patients comme l'âge, le sexe, s'ajoute à cela le problème du délai de rendu des résultats bactériologiques : au moins 48 heures sont nécessaires pour obtenir un résultat sur la susceptibilité bactérienne aux antibiotiques. Pour palier à cela, des antibiotiques à large spectre sont en général administrés puis réajustés après analyse des résultats bactériologiques. Cependant cette pratique qui a pour but d'optimiser la prise en charge des patients, doit participer à la sélection de pathogènes résistants aux antibiotiques (**Bauer and Reinhart, 2010**).

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier où la pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution

Après ce bref rappel de littérature sur les types de bactéries responsables des infections septicémiques concernées par notre travail, leurs mécanismes de résistance, ainsi que les BLSE, il s'agit maintenant d'analyser les caractéristiques des patients inclus dans notre étude, et les différentes souches isolées, pour cela notre travail a consisté à collecter des prélèvements issus de l'hôpital pédiatrique Sainte-Thérèse et ont été soumis aux diverses analyses au niveau du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Dorban de Annaba. Nous avons par ailleurs effectué une étude génotypique qui s'est déroulée au CHU de La-Timone (France) et dont on a effectué une deuxième identification des souches par MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation TOF, Time-Of-Flight mass spectrometry) puis une détection des gènes de résistance *bla* gène (CTX-M, TEM, et SHV) par PCR multiplex et enfin un séquençage des gènes trouvés analysés par Codon code aligner et alignés par le centre de biotechnologie information.

PARTIE 1 :REVUE DE LA LITTERATURE

Chapitre 1 :l'infection bactérienne (Bryce et al;2005)

Généralités

L'infection est définie par l'envahissement de tout ou partie de l'organisme par des micro-organismes (bactéries, virus, champignons ou parasites). La gravité de l'infection se manifeste par des signes inflammatoires, réaction de l'hôte contre l'envahissement, qui peuvent aller jusqu'au choc septique et jusqu'aux défaillances viscérales. Tous ces signes constituent l'état septique, ou sepsis des anglo-saxons, terme qui tend de plus en plus à être utilisé en France.

La porte d'entrée de l'infection est très variable. La septicémie peut se développer à partir d'une infection respiratoire (par exemple, une pneumonie), une infection digestive (une péritonite), une infection urinaire (causées parfois par les sondes) ou encore génitale. Elle peut aussi être d'origine cutanée, comme avec une blessure mal soignée, un furoncle ou encore un panaris. La plupart du temps, la septicémie est donc liée à des bactéries, mais les virus et les levures peuvent aussi en être à l'origine.

Le germe est présent dans le corps sans qu'il y ait pour autant de symptôme visible. Par la suite, le système immunitaire reconnaît l'intrus, il réagit en libérant différentes substances dans le sang. La réaction inflammatoire va se traduire, en fonction du germe, soit par une fièvre soit, au contraire, par une baisse de la température. La septicémie, dont l'évolution est insidieuse, est d'autant plus grave chez les très jeunes enfants, les personnes âgées ou celles qui ont un système de défense plus fragile.

Ensuite, une cascade d'événements se succèdent et quand le système immunitaire est dépassé, il réagit mal, les substances libérées dilatent les vaisseaux, la circulation sanguine ralentit, et la tension chute.

A ce stade, la vie du patient est en danger, la septicémie évolue vers un choc septique. Il faut alors identifier le germe responsable pour donner le bon traitement. Et dans tous les cas, il faut rechercher la porte d'entrée de l'infection. Si la localisation est profonde, comme cela peut être le cas pour certains abcès, le traitement chirurgical est indispensable pour éradiquer le foyer infectieux.

1. Comment apprécier la sévérité du sepsis? (Caille et al, 2004; Burn Buisson, 2000)

La sévérité d'une maladie dépend de nombreux facteurs qui peuvent être classés en facteurs chroniques ou aigus. Les facteurs chroniques représentent la réserve physiologique: l'âge en fait partie, de même que l'état de santé.

Ce dernier peut être évalué par la mobilité (les quatre classes A, B, C, D de Knaus) ou par l'existence de maladies chroniques. Le score de Mac Cabe, publié il y a 20 ans à propos des septicémies à bacilles à Gram négatif, est toujours utilisé ; il définit trois groupes de patients : sans maladie chronique, avec maladie chronique dont la survie est de cinq ans au moins, avec maladie chronique dont l'espérance de vie ne dépasse pas un an. De plus en plus, actuellement, sont mis en évidence des facteurs génétiques qui pourraient impliquer les différences de comportement des individus devant des infections similaires. Les facteurs aigus sont représentés par les désordres cliniques et biologiques (parfois appelé « score physiologique ») ; le diagnostic de la maladie aiguë, le « biais du temps écoulé » (*leads time bias*) qui traduit le retard au traitement, ou qui tient compte des modifications qu'un traitement préalable a pu produire dans le score physiologique. En matière de diagnostic, les caractéristiques de l'infection interviennent: localisation de l'infection, nature du germe, existence d'hémocultures positives Nous ne considérerons pas ici les systèmes prenant en compte les dosages de TNF et d'IL1(qui sont des cytokines pro-inflammatoires; la première agit au niveau du foie lors d'une infection en induisant la synthèse de molécules de la phase aiguë de l'inflammation ,et la deuxième agit au niveau de l'hypothalamus lors d'une infection, afin d'induire la synthèse de prostaglandine) car ils ne constituent pas à proprement parler des modèles de probabilité; d'autre part, ils nécessitent des prélèvements et des dosages spécifiques qui ne sont possibles que dans certains laboratoires. Ils ne peuvent être utilisés en pratique courante.

2. Bases théoriques des scores de gravité

Quels sont les buts des scores de gravité ? Autrement dit, pourquoi utiliser des scores de gravité (spécifiques ou non) dans le sepsis ? Les scores sont utilisés essentiellement dans les essais thérapeutiques, afin de vérifier que les groupes « traité » et « témoin », sont comparables. On a pu également utiliser des modèles de probabilité fondés sur des scores, comme le SAPS II « customisé » c'est-à-dire adapté au sepsis . Dans ce cas, une probabilité de mortalité est établie dans une base de données en fonction de la gravité des patients. Dans un autre groupe de patients, soumis à un traitement spécifique, on observe la différence entre

mortalités prédite et observée. Cependant, cette technique n'a pas été poursuivie car elle était à l'origine de biais importants. Les scores peuvent aussi être utilisés au moins théoriquement pour identifier un groupe de patients pour lesquels un traitement coûteux est peut être efficace: un tel traitement ne saurait être employé pour les patients trop peu sévères qui ont de toute façon un bon pronostic ou, au contraire, très sévères qui sont de toute façon condamnés. C'est dans le groupe de gravité intermédiaire défini par un score précis que le traitement peut être efficace. (Pradhan, R et al 2012).

3. Objectifs des scores de gravité

Les scores ou indices de gravité stratifient les patients en fonction de leur pronostic. Les scores statiques sont établis à l'admission, dans les premières 24 h pour établir la probabilité de décès hospitalier. Les scores dynamiques sont répétés à intervalles variables.

Les scores de sévérité estiment la probabilité de mortalité pour des groupes de patients. La probabilité individuelle vise à obtenir une prédiction aussi précise que possible, mais les problèmes méthodologiques ne sont pas encore résolus. C'est dans ce deuxième objectif que les scores répétitifs –ou dynamiques– sont conçus. Le taux de mortalité standardisé (*standard mortality ratio*) est défini comme le rapport entre la mortalité observée et la mortalité prédite. Ce chiffre peut être utilisé pour guider l'utilisation des ressources ou améliorer la qualité. Les scores de sévérité peuvent aussi être utilisés dans la recherche clinique pour stratifier les patients, comparer les groupes traités et non traités.

Les scores de gravité doivent répondre à des qualités mathématiques précises. Différentes méthodes permettent d'apprécier la précision d'un score.

4. Recherche d'exactitude

Les scores récemment publiés sont utilisés dans une équation donnant la probabilité de décès hospitalier. La qualité de cette probabilité est évaluée par la mesure de la calibration, de la discrimination et de la fiabilité. La calibration estime l'étroitesse de la corrélation entre les mortalités prédite et observée dans les différentes classes de sévérité. Elle est mesurée par le test de *goodness of fit* (qualité de l'adéquation) où un $p > 0,05$ indique une bonne calibration.

La discrimination examine comment le modèle sépare les individus qui survivront de ceux qui décéderont. Ce paramètre est mesuré par l'aire sous la courbe ROC (*receiver operating characteristics*) où une aire à 0.5 indique l'absence de discrimination, 0,9 une discrimination excellente, 1,0 une discrimination parfaite. La fiabilité intra- et inter observateurs est mesurée par la concordance dans le recueil des données pour le même patient. En général, plus la

subjectivité d'une donnée augmente (par exemple, le choix d'un diagnostic principal), plus la fiabilité décroît.

Chapitre 2: Hémoculture

1. Introduction

L'hémoculture est une technique de laboratoire dont le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence de microorganismes (bactéries et levures) dans le sang et d'étudier leur sensibilité aux différents antibiotiques selon les cas. **(FAUCHERE JL, 1997.)**

L'hémoculture est un élément capital du diagnostic, du pronostic et du traitement de nombreuses infections sévères s'accompagnant de passage bactérien dans le sang.

C'est un moyen simple et efficace qui a pour objectif de démontrer dans les meilleurs délais la présence de micro-organisme dans le sang (bactéries, champignons) leur identification et leur sensibilité aux antibiotiques/Antifongique.

L'importance de l'intérêt diagnostic et thérapeutique devant la diversité des états infectieux, explique sa prescription presque systématique en milieu hospitalier. **(PHILIPPON A et al;1983).**

L'hémoculture est un examen très performant. Il est sensible (on détecte, en théorie une seule bactérie viable dans l'échantillon examiné). **(FAUCHERE JL, 1997).**

Pour avoir quelques chances de succès, les hémocultures doivent être faites le plus tôt possible; a la phase de début de la maladie avant la réponse anticorps et surtout avant tout traitement antibiotique.

Le sang contient des facteurs limitant la croissance bactérienne (phagocytes, complément, lysozyme, anticorps, parfois antibiotiques).

Il est nécessaire de diminuer leur activité en diluant le prélèvement dans une grande quantité de milieu de culture. C'est aussi pourquoi il faut systématiquement subcultiver les hémocultures.**(CHIRON JP et al,1997).**

Les milieux de cultures utilisés sont liquides, semi-gélosés ou bi phasiques. Ces milieux doivent permettre la croissance de la plupart des bactéries rencontrées en médecine (bouillon coeur-cerveille, trypticase soja, milieu au thioglycolate pour anaerobie).

Divers flaconnages sous pression réduite facilitent et rendent plus sûre la pratique de l'hémoculture c'est le cas du flacon de BACTECR.

Des automates (BACTECR chez Becton Dickinson, Argos chez Sanofi- Pasteur, Vital chez bio Merieux, Bact Alert chez Organon Technica...) permettent aujourd'hui de détecter les

hémocultures positives grâce à la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance des bactéries (CO₂, ion H⁺, variation du potentiel redox du milieu).

Ces méthodes présentent des avantages certains comme les lectures multiples ou même en continu au cours des heures qui suivent le prélèvement, l'incubation sous agitation et la détection standardisée des hémocultures positives.

Globalement ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats à la fois grâce à la vitesse de croissance des bactéries dans ces conditions, à la sensibilité de la détection et à la multiplicité des lectures. (PHILIPPON A, et al;1983).

Dans le but d'un diagnostic rapide pour une meilleure prise en charge des états bactériémiques, la collaboration étroite entre le clinicien et le microbiologiste s'avère donc nécessaire.

2. Généralités

2.1. Rappels cliniques

- Sang et bactérie : Le sang est un liquide stérile. Cependant, à partir de sites ou de foyers infectieux, différents germes tels que les bactéries, les champignons peuvent être relargués dans le sang. La présence de bactéries dans le sang ou bactériémie, peut être accompagnée de manifestations cliniques d'une infection grave, notamment de frissons, de fièvre, de signes de toxicité et d'hypotension.(APPIT, 1996.)

- Physiopathologie

La présence de bactéries dans le système circulatoire déclenche un ensemble de mécanismes dont l'effet sera l'apparition de divers signes cliniques. L'événement initiateur est la libération par l'agent causal :

-De débris de paroi : peptidoglycane, acide teichoïque

-D'endotoxines produites par les bacilles à Gram négatif. Ce sont des lipopolysaccharides dont le noyau lipidique central (lipide A) est presque toujours identique d'une bactérie à une autre et constitue la partie toxique de ces molécules. C'est pourquoi il a été envisagé la possibilité que des anticorps réagissant de façon croisée avec le noyau de l'endotoxine puissent conférer une protection vis à vis d'une grande variété de souches bactériennes.(VANDEPITTE J et al;2003).

2.2. Hémoculture

2.2.1. Définition

Le terme « hémoculture » peut se définir de deux manières selon le contexte d'utilisation. En règle générale, l'hémoculture est la technique microbiologique qui consiste en

ensemencement d'un milieu de culture avec une petite quantité de sang prélevé sur un sujet afin de déterminer les microorganismes qui l'affectent.

Une hémoculture, en langage usuel, correspond à une série de plusieurs (minimum 3) flacons issus d'une même ponction veineuse. (GOULON M, 1985.)

2.2.2. Paramètres analytiques

Différents facteurs influent sur la positivité d'une hémoculture.

2.2.2.1. Faible densité bactérienne

Les bactéries sont le plus souvent en simple transit passif dans le sang. Le nombre de bactéries mis en culture, est alors faible et souvent de l'ordre de 1 bactérie/ml. Il est donc nécessaire d'ensemencer plusieurs ml de sang dans divers flacons et à plusieurs reprises pour majorer les chances de positivité d'une hémoculture. (CONTREPOIS A. 1995)

Les répétitions des cultures permettent de :

- diminuer les chances de manquer une bactériémie transitoire.
- confirmer le rôle pathogène d'isollements "saprophytes" tel que *Staphylococcus epidermidis*, si l'on les retrouve dans plusieurs prélèvements veineux.

Le volume de sang prélevé est la variable la plus importante. Plusieurs études révèlent une relation directe entre le volume de sang et le rendement de la technique. Le volume permet une augmentation significative du rendement:

- Pour un prélèvement de 20 ml à 40 ml : + 10% de positivité
- Pour un prélèvement de 40 ml à 60 ml : + 19% de positivité

Une augmentation de volume entraîne une augmentation de la sensibilité.

2.2.2.2. Vitalité bactérienne

l'activation des différents mécanismes de défense de l'organisme, suite à une bactériémie, affecte la vitalité des corps bactériens recueillis lors du prélèvement. Plusieurs éventualités se présentent :

- Les corps bactériens sont intacts: ils sont soit libres dans le plasma en phase de multiplication ou bien ils correspondent à des bactéries au repos.
- Les corps bactériens lésés ou masqués du fait du système immunitaire ou l'effet des antibiotiques.
- Les corps bactériens sous forme "L": correspondent à des bactéries déficientes nutritionnelles.

La faible densité bactérienne, l'état lésé des corps bactériens, la phagocytose, expliquent que la mise en évidence de la positivité d'une hémoculture est très souvent retardée dans le temps

par rapport à la rapidité d'obtention des cultures de repiquage au laboratoire. (ANAGONOU SY et al;1993).

2.2.2.3. Milieux d'hémoculture

De très nombreux milieux présentés en flacon sous pression réduite, permettant l'ensemencement direct à travers un opercule de caoutchouc, sont proposés par les fabricants. Pour favoriser la multiplication des corps bactériens en faible densité, recueillis lors du prélèvement il est nécessaire de procéder à une primo-culture.(SAMAKE M, 2004).

- Choix du bouillon

Le bouillon pour hémoculture doit favoriser la croissance des bactéries cliniquement importantes.

Plusieurs bouillons sont utilisés :

- bouillon coeur- cervelle
- bouillon trypticase –soja
- milieu au thioglycolate pour les anaérobies.

Un accent est mis sur la quantité de bouillon à ensemencer. Dans l'idéal, l'O.M.S recommande de mélanger le sang avec dix fois son volume de bouillon soit pour 5 ml de sang un équivalent de 50 ml de bouillon.

-Facteurs de croissance

Certaines bactéries telles que les Streptocoques responsables de certaines endocardites ont des besoins spécifiques pour leur croissance. Aussi, les bouillons doivent être enrichis d'additifs; ces facteurs sont le plus souvent présents dans le sang du prélèvement.

Quel que soit le milieu, plusieurs additifs sont proposés:

- Atmosphère

La plupart des milieux commercialisés ont une atmosphère enrichie en CO₂ et en Azote (N₂). L'enrichissement en oxygène pour les germes aérobies se fait au moment du prélèvement.

- Anticoagulants

Outre son rôle d'inhibition de la coagulation sanguine, il vise aussi à neutraliser les effets antibactériens du sérum et des phagocytes.

Une concentration à 0,025% limite son effet inhibiteur sur la croissance des *Neisseria* et des *Peptostreptococcus*.

L'anticoagulant habituellement utilisé est le: Polyanéthol Sulfonate de Sodium (S.P.S) d'autres anticoagulants tels que le citrate, l'héparine sont aussi utilisés.

- **Saccharose**

Une concentration de 10 à 15% de saccharose éviterait la lyse des bactéries à paroi déficiente. Son efficacité n'est cependant pas encore démontrée.

Molécules à groupement « thiol » ou « pyridoxal »

Elles favorisent la croissance des bactéroïdes et de certains Streptocoques.

Le groupement thiol neutralise un certain nombre d'antibiotiques, notamment les aminosides.

- **Facteurs de croissance**

L'hémine, la vitamine K3, favorisent le développement des bactéries exigeantes et des anaérobies.

- **Inhibiteurs d'antibactériens**

La pénicillinase inactive les β -lactamines en occurrence les pénicillines.

L'acide para-amino-benzoïque neutralise les sulfamides.

Si divers milieux sont proposés, leurs compositions sont le plus souvent l'objet de protection industrielle.

- **Flacons d'hémoculture**

- **Constitution des flacons**

De très nombreux milieux sont présentés par les fabricants en flacons sous pression réduite, permettant l'ensemencement direct à travers un opercule de caoutchouc. Ils contiennent le bouillon nécessaire pour la primo culture du prélèvement sanguin.

- **Typologie des flacons**

Malgré la diversité des flacons sur le marché, deux types de flacons sont proposés au clinicien en pratique courante pour respecter le type respiratoire des micro-organismes.

Flacons aérobies

Grâce à leur atmosphère enrichie en oxygène, ils favorisent la croissance et la multiplication des bactéries aérobies strictes rencontrées en clinique. Le milieu de culture est mono ou biphasique.

Flacons anaérobies

Ces flacons grâce au bouillon spécifique qu'ils renferment, favorisent la culture des bactéries anaérobies strictes.

Flacons spéciaux

D'autres types de flacons sont proposés en fonction de la clinique du patient par les fabricants.

2.2.4. Etude bactériologique

Dès réception au laboratoire les flacons doivent être incubés à 35-37°C et inspectés régulièrement.

2.2.4.1. Détection manuelle

-Inspection journalière

L'inspection macroscopique journalière des flacons, vise à déceler des signes d'une croissance microbienne. Une culture stérile montre en général un dépôt d'hématies recouvert d'un bouillon transparent jaune pale. La croissance est attestée par :

- Un dépôt flocculeux au-dessus de la couche d'hématies
- Un trouble uniforme se situe juste sous la surface
- Une hémolyse
- Une coagulation du bouillon
- Une pellicule de surface
- La production de gaz carbonique
- La présence de grains blancs à la surface ou à l'intérieur de la couche de sang.

La durée d'observation varie de 10 jours à un mois surtout pour les bactéries à culture lente.

Toute positivité d'un flacon entraîne un examen microscopique.

- **Examen microscopique**

Devant une croissance visible, le flacon est ouvert aseptiquement et une petite quantité de bouillon est prélevée à l'aide d'une anse stérile ou d'une pipette Pasteur. Un frottis coloré par la méthode de Gram permet de repérer la présence de germes. Le prélèvement du bouillon peut être exécuté à l'aide d'une seringue montée après désinfection de l'opercule de caoutchouc.

Un examen microscopique est complété par des repiquages sur milieux solides.

- **Repiquage et isolement - Identification**

La réalisation des repiquages se fait en ensemençant en stries le contenu d'une anse ou d'une goutte de bouillon prélevée à la seringue, sur des milieux solides appropriés.

L'identification du germe se fera selon l'aspect des colonies sur des différents milieux de repiquage. Dans des conditions où les risques de souillure sont élevés, il est possible de procéder à des subcultures « à l'aveugle ».

Pour toute détection manuelle, plusieurs systèmes sont aussi utilisés.

- Systèmes Signal : détection de la surpression dans le flacon liée à la croissance bactérienne par passage du bouillon de culture à travers une aiguille fixée dans la partie supérieure du flacon.

- Systèmes Isolator : système de « lyse-centrifugation » permettant de recueillir et de concentrer les micro-organismes à partir du ganglion et des leucocytes. Ce système est performant pour les mycobactéries, les levures à croissance difficile, les champignons filamenteux, et les bactéries exigeantes.(Levy et al., 2003).

2.2.4.2. Détection automatisée

Divers automates (BACTECR 9050, Bio Argos, Bact Alert, Organon Technica) permettent aujourd'hui de détecter les hémocultures positives par la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance bactérienne.

Ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats. Leur seul inconvénient est le coût onéreux.

Différents systèmes plus sophistiqués sont proposés mais ils n'ont pas fait la preuve évidente d'une supériorité pour la détection de positivité des hémocultures.

- Résultats - Interprétation :

Les résultats d'une hémoculture peuvent revêtir deux aspects :

-Résultats normaux

Pour confirmer le diagnostic d'une septicémie, il faut s'assurer que toutes les conditions techniques ont été réunies, à savoir: milieux nutritifs stériles, absence d'antibiothérapie, prélèvements effectués au bon moment et de manière rigoureuse, milieux de culture de qualité, atmosphère de CO₂, condition d'aérobiose et/ou d'anaérobiose.

Par ailleurs, un résultat positif isolé peut être dû à une simple bactériémie physiologique ou encore la traduction d'une contamination exogène du prélèvement par les bactéries de la peau ou de l'air.

-Résultats pathologiques (GORO D, 2002)

L'interprétation des résultats est parfois délicate et nécessite une étroite collaboration entre le clinicien et le microbiologiste.

Schématiquement, on peut distinguer trois types de résultats :

- **Premier cas** : Plusieurs hémocultures pratiquées chez un même patient sont positives et contiennent la même espèce bactérienne. L'interprétation est aisée, le diagnostic de bactériémie pathologique peut être posé et la bactérie considérée comme responsable même si elle n'est pas reconnue comme une bactérie pathogène opportuniste.

Cependant dans certains cas, en fonction de la porte d'entrée, les hémocultures positives peuvent être poly microbiennes chez un même sujet.

L'interprétation est plus difficile. La localisation du foyer infectieux permet de régler en général le problème. Ils sont surtout observés en cas de cathéters longtemps maintenus en place ou chez les patients immunodéprimés et très souvent chez les agonisants.

- **Deuxième cas:** Sur l'ensemble des hémocultures pratiquées chez un malade, une seule est positive. L'interprétation consistera ici à démontrer que le germe isolé provient ou non d'une contamination.

-S'il s'agit d'une bactérie pathogène spécifique, elle peut être considérée comme responsable.

-S'il s'agit au contraire d'une bactérie peu fréquemment retrouvée comme germe de souillure, en l'occurrence les Entérobactéries, les Streptocoques, elle peut être considérée comme responsable surtout si le foyer infectieux est évocateur ou si le contexte clinique est en faveur de sa responsabilité.

La bactérie est fréquemment responsable de contamination. Sa responsabilité ne sera admise que si le même germe est découvert au niveau du foyer infectieux ou de la porte d'entrée.

- **Troisième cas:** Toutes les hémocultures réalisées sont négatives. Un tel résultat est un bon argument pour éliminer une septicémie, à condition bien sûr que les conditions de réalisation aient été scrupuleusement observées.

Cependant, plusieurs hémocultures peuvent être négatives malgré une clinique évocatrice. Plusieurs causes d'échec peuvent expliquer l'obtention de faux négatifs :

- Prélèvement effectué au mauvais moment ou tardivement

-Prélèvement fait sous antibiothérapie

-Quantité insuffisante de sangensemencé

- Milieux ou conditions de cultures inappropriés

- Temps d'observation trop court

- Mauvaise observation des flacons

-Mauvais choix des conditions de subcultures.

Pratiquée avant toute antibiothérapie, et suivant un protocole rigoureux devant maintenir continuellement une aseptie totale, l'hémoculture constitue l'élément capital du diagnostic d'une bactériémie physiologique ou pathologique.

2.2.5. Principaux germes des hémocultures

Il convient tout d'abord de distinguer les bactériémies vraies des contaminations. Si les bactériémies vraies sont le plus souvent mono microbiennes, une hémoculture positive poly microbienne (associée à certaines espèces) oriente plutôt vers une contamination du prélèvement. *Bacillus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*, bactéries de la flore cutanéo-muqueuse, sont des contaminants dans plus de 95% des cas. Les staphylocoques coagulase

négative (85% de contaminants), les entérocoques (20% de contaminants), et les streptocoques du groupe viridans (60% de contaminants) peuvent cependant, dans un certain nombre de cas, être responsables de bactériémies vraies: La distinction vrai/ faux positif pourra se faire en répétant les hémocultures chez le malade et surtout en tenant compte de la clinique. (BAUDAT V 2002).

2.2.5.1. Cocci à Gram Positif :

- Genre Streptococcus

-*Streptococcus pneumoniae*

-Streptocoques Béta hémolytiques

- Streptococcus pyogènes (ou Streptocoques du groupe A)
- Streptococcus agalactiae (ou Streptocoque du groupe B)

-Genre Enterococcus

-Genre Staphylococcus

- *Staphylococcus aureus*
- autres Staphylocoques

Les Staphylocoques autres que *Staphylococcus aureus* sont souvent identifiés aux espèces non productrices de coagulase et sont connus comme "staphylocoques a coagulase negative" (SCN). Leur identification se faisant par opposition a *Staphylococcus aureus*, le terme de "*Staphylococcus non aureus* " (SNA) serait cependant préférable. Ce sont les principaux commensaux de la peau mais ils sont également isolés des muqueuses.

La densité de colonisation est plus importante au niveau des régions situées à proximité des orifices ou les zones humides comme la partie antérieure des narines, le périnée, les creux axillaires et les plis inguinaux. (Hussein et al., 2009).

2.2.5.2. Cocci à Gram négatif :

Généralité sur les Neisseriaceae

Neisseria meningitidis ou méningocoque est un diplocoque a Gram négatif intracellulaire en majorité en forme de grain de café mesurant 0,8 a 1µm de diamètre, Il est responsable de la méningite cérébro-spinale épidémique.

Le méningocoque appartient à la famille des Neisseriaceae qui comprend actuellement deux genres d'intérêt médical :

- Le genre Neisseria

- Le genre kingella

2.2.5.3. Bacilles à Gram Négatif

Les bactéries à Gram négatif sont mises en évidence par la coloration de Gram.

1. Généralités sur les Entérobactéries

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae*. Si le nom de famille est toujours maintenu, en revanche le classement des bactéries dans la famille a beaucoup évolué (Joly B. et Reynaud A, 2007).

Actuellement, les Entérobactéries sont classées sur la base du séquençage des ARN 5S et 16S dans: *K. pneumoniae* est une espèce ubiquitaire. Elle peut être isolée de l'environnement (sols, eaux de surface, eaux usées, végétaux) ainsi que des flores commensales de l'homme et des animaux. Elle colonise jusqu'à 30% des individus au niveau des muqueuses digestive et nasopharyngée. La colonisation augmente de façon très importante chez les patients hospitalisés.

Domaine : *Eubacteria* ;

- Phylum XII : *Proteobacteria*
- Classe : *Cammaproteobacteria*
- Ordre des Enterobacterales
- Famille des *Enterobacteriaceae* (Meyer A., et al, 2004).

Quarante quatre genres sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives: *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersinia* et *Erwiniae* (Larpen, 2000). Les genres les plus communément isolés en bactériologie clinique sont (Morice, 2003).

- *Citrobacter*,
- *Enterobacter*
- *Escherichia*
- *Hafnia*,
- *Klebsiella*,
- *Morganella*,
- *Proteus*
- *Providencia*
- *Salmonella*
- *Serratia*
- *Shigella*
- *Yersinia*

Le nom « entérobactérie » fait référence à la localisation de cette famille de microorganismes dans le tube digestif et principalement le côlon de l'homme et des animaux (Scheftel, 2008). La famille des entérobactéries se définit par un ensemble de caractères généraux communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, le plus souvent mobiles grâce à une ciliature péritriche mais immobiles dans le cas des bactéries des genres *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia pestis*.

Elles fermentent le D-glucose avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites. Elles n'ont pas d'oxydases et possèdent une catalase (Joly B. et Reynaud A, 2007). Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et elles se cultivent sur les milieux ordinaires. La température optimale de croissance est 37°C mais la culture est possible entre 20°C et 40°C.

Les entérobactéries fréquemment rencontrées en bactériologie clinique, alimentaire, des eaux, sont succinctement présentées en considérant leur habitat naturel ou leur habitat lié aux activités anthropiques leurs caractères particuliers, leurs pouvoirs pathogènes ou leur intérêt (Delarras, 2007). Seuls les genres et les espèces qui ont un intérêt médical reconnu seront envisagés par la suite. Une centaine d'espèces d'*Enterobacteriaceae* sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99% des souches isolées en clinique (Avril et al., 2000).

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles, en diplobacilles, généralement capsulées (Delarras, 2007) et fermentent de nombreux sucres avec production de gaz, mais elles ne sont pas protéolytiques. Sur milieu gélosé, les colonies sont caractéristiques: elles sont volumineuses, bombées, brillantes et très visqueuses à cause de la capsule (Fauchère, 2002).

Le genre *Klebsiella* comporte actuellement cinq espèces *K. pneumoniae* comportant 3 sous espèces: *K. pneumoniae* sub sp. *Pneumoniae*, *K. pneumoniae* sub sp. *ozanae* et *K.pneumoniae* sub sp. *Rhinoscleromatis*; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella ornithinolytica*; *Klebsiella terrigena* et *Klebsiella planticola*.

L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, germe très répandu dans la nature (sol et eau), saprophyte des voies respiratoires supérieures et il est l'agent des surinfections respiratoires (Lamnaouer, 2002). *Klebsiella pneumoniae* est un pathogène à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères. De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez des patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (Carrër et Nordmann, 2009; Boukadida et al., 2002).

1.2. *Enterobacter cloacae*

Les *Enterobacter* sont des bacilles à Gram négatif généralement mobiles, fermentent ou non le lactose et ils ont une β -galactosidase (Fauchère, 2002).

Différentes espèces constituent ce genre. Certains n'ont jamais été associés à des infections humaines. Les espèces les plus souvent isolés incluent *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*, suivie par *Enterobacter sakazakii*. Les espèces du genre *Enterobacter*, en particulier *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*, sont des pathogènes responsables d'infections nosocomiales diverses, y compris la bactériémie, les infections des voies respiratoires et urinaires, l'endocardite, les infections intra abdominales et ophtalmiques, l'arthrite septique et les ostéomyélites (Fraser et al, 2010). *Enterobacter sakazakii* est l'agent d'infections rares mais sévères touchant particulièrement les très jeunes enfants, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés. Cette espèce se différencie des autres *Enterobacter* par son pigment jaune (Leclercq M., 2006).

1.3. *Escherichia coli*

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique (Avril et al, 2000). Elle représente l'espèce type de genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille » cette espèce possède des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines.

La production d'indole à partir de tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétoïne (réaction de Voges- Proskauer négative) (Joly B. et Reynaud A, 2007). *Escherichia coli* se retrouve en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante (Ahoyo et al., 2007; Bonacorsi et al, 2001).

1.4. *Serratia marcescens*

Toutes les *Serratia* possèdent une gélatinase et une DNase sauf (*S. fonticola*) (Denis et al, 2007). D'une manière générale, les espèces de ce genre sont isolées des plantes (légumes, champignons, mousses), du tube digestif des rongeurs (40% des petits mammifères sauvages sont porteurs de *Serratia spp.*), des insectes, de l'eau et du sol (Euzéby, 2003).

Le genre *Serratia* comprend maintenant dix espèces (Sekhsokh et al., 2007). La principale espèce pathogène du genre est *Serratia marcescens* qui provoque habituellement des

infections nosocomiales. Toutefois, des souches de *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea* et *S. odorifera* ont causé des infections (Basilio et Anía, 2009).

Chapitre 3 : Les β -lactamines

Généralités

Le mot antibiotique a été proposé en 1941, par Waksman, (découvreur de la streptomycine), pour désigner toute substance produite par un micro-organisme et qui a le pouvoir d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes et même de les détruire, cette notion s'étend aux substances semi-synthétiques ou même synthétiques, ayant la même la fonction. (Guillemot et al., 2001) (Patrice Courvalin,2001).

1. Définition

Les β -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur efficacité, leur faible toxicité et leur faible cout pour certaines molécules bactéricides. (Livermore, 1995a). Elles sont utilisées dans de nombreuses pathologies infectieuses dues aux entérobactéries (Zogheib et Dupont, 2005). Ce nom est du au fait que tous les membres de cette classe portent une fonction lactame en position β (figure 1).

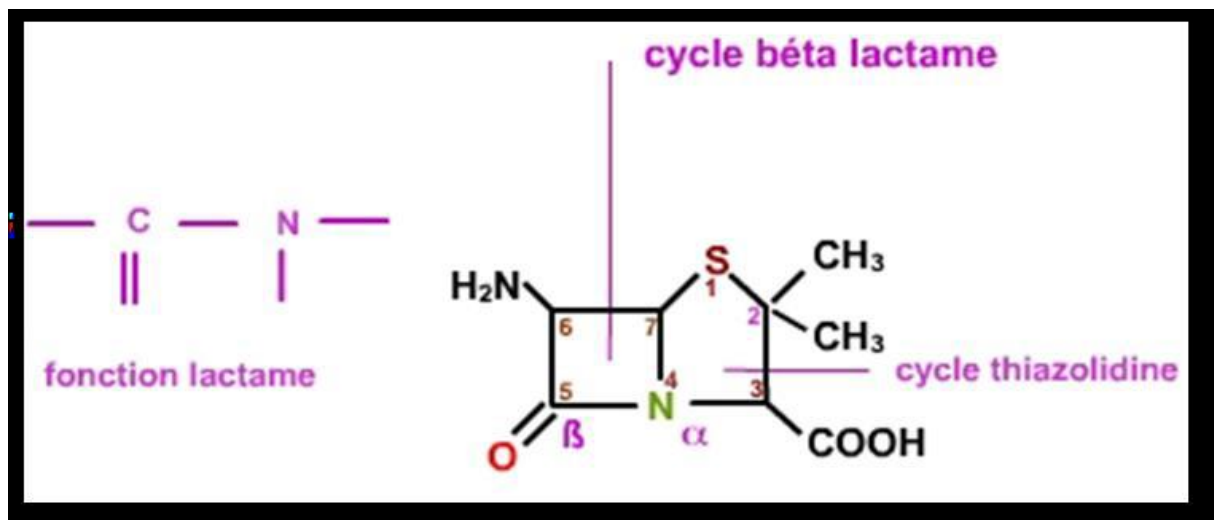


Figure 1. Cycle β -lactame (Bonnet R, 2006).

La famille des β -lactamines est caractérisée par une structure qui présente un cycle constant β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. En fonction du cycle

adjacent, plusieurs familles se distinguent, ce qui explique la diversité des molécules : pénicillines (cycle péname), céphalosporines (cycle céphème), carbapénèmes (cycle pénème) et les inhibiteurs des béta-lactamases (cycle clavame). Les β -lactamines sont des antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (Cavallo et al. 2004).

1.1. Les pénicillines (Ferres and Nunn, 1983)

▪ La benzylpénicilline (pénicilline G)

La benzylpénicilline a été la première pénicilline utilisée. Elle possède un spectre antibactérien qui couvre les cocci à Gram positif, cocci à Gram négatif ex : *Neisseria meningitidis* et les bacilles à Gram positif ex : *Listeria monocytogenes*.

▪ Les isoxazolyl-pénicillines (pénicilline du groupe M)

Possèdent des modifications structurales qui permettent une augmentation de la stabilité à l'hydrolyse par les pénicillinases mais qui entraînent souvent une diminution de l'activité antibactérienne.

▪ Les amino-pénicillines (pénicilline du groupe A)

Possèdent une activité sur les bacilles à Gram négatif ex : *Escherichia coli*

L'ampicilline et l'amoxicilline appartiennent à ce groupe.

L'amoxicilline ne diffère de l'ampicilline que par un groupement hydroxyle qui lui confère une meilleure biodisponibilité par voie orale que l'ampicilline. La pivampicilline fait partie d'un groupe d'ester de l'ampicilline qui libère l'ampicilline suite à l'action des estérases digestives extra- et intracellulaires. Ces prodrogues ont été développées pour améliorer la biodisponibilité de l'ampicilline par voie orale.

▪ Les uréido-pénicillines et les carboxy-pénicillines

Possèdent un spectre élargi à certains bacilles à Gram-négatif, ainsi que sur certaines souches productrices de céphalosporinases. Les amino-pénicillines présentent un spectre limité aux bacilles à Gram négatif.

1.2. Les céphalosporines (Allain P, 2008)

Ces β -lactamines sont toutes à large spectre et leur intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif.

Les céphalosporines sont traditionnellement divisées en quatre générations sur la base de leur spectre antibactérien, et surtout de leur comportement vis-à-vis des céphalosporinases.

▪ Les céphalosporines de première génération (C1G)

Possèdent un spectre qui couvre les cocci à Gram positif ainsi certaines bactéries à Gram négatif ex : *Klebsiella pneumoniae/oxytoca* mais elles sont résistantes à *Enterobacter*

aerogenes/cloacae. Ce sont les moins stables vis-à-vis de l'hydrolyse par les β -lactamases, Ex : Céfalotine, Céfazoline.

- **Les céphalosporines de deuxième génération (C2G)**

Possèdent une bonne activité contre les bactéries à Gram négatif. Elles sont stables à l'hydrolyse par les β -lactamases d'origine plasmidique (non BLSE), mais pas à l'hydrolyse par les céphalosporinases d'origine chromosomique AmpC. Ex : céfoxitine, céfamandole, céfotétane, céfuroxime.

- **Les céphalosporines de troisième génération (C3G)**

Possèdent une couverture plus large contre les bactéries à Gram négatif. De plus, leur stabilité en présence de β -lactamase d'origine chromosomique AmpC est nettement supérieure à celles des céphalosporines de première et deuxième générations. Ex : céfotaxime, céfopérazone, ceftazidime, ceftriaxone, céfixime.

- **Les céphalosporines de quatrième génération (C4G)**

Ces molécules sont particulièrement efficaces vis-à-vis des bacilles à Gram négatif possèdent une stabilité accrue contre certains types de β -lactamases et ont la propriété de résister à l'hydrolyse des céphalosporinases hyperproduites grâce à une double caractéristique. Elles possèdent une très faible affinité pour ces céphalosporinases ainsi qu'une bonne affinité pour les protéines liant les pénicillines (PLP). Ainsi, elles agissent avant que les enzymes bactériennes n'aient eu le temps de les dégrader (**Bryskier, 1984**).

Même si les céphalosporines de quatrième génération sont plus stables à l'hydrolyse par les β -lactamases à spectre étendu, elles demeurent néanmoins hydrolysées par les plus efficaces d'entre elles. Ex. Céfépime, Cefpirome.

1.3. Les carbapénèmes

Sont des β -lactamines possédant un très large spectre anti-bactérien doublé d'une grande stabilité envers la quasi-totalité des β -lactamases. Pour cette raison, ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabiliste des infections pathogènes. Le plus ancien carbapénème est : L'imipénème, substance dérivée d'un composé produit par la bactérie *Streptomyces cattleya*.

Le méropénème, apparu environ dix ans plus tard, est largement utilisé en Europe et en Amérique du Nord. Le début des années 2000 a vu l'apparition de nouvelles carbapénèmes : L'értapénème et le doripénème.

1.4. Les Monobactames (Jean-Louis Pourriat, 2005)

Cette classe de β -lactamines ne contient qu'un seul agent antibiotique : L'aztréoname, son spectre couvre uniquement les bacilles à Gram négatif, y compris *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5. Les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactame, sulbactame)

Les inhibiteurs des β -lactamases ont été développés afin de neutraliser la production bactérienne de β -lactamases.

Les inhibiteurs des β -lactamases possèdent une activité antibiotique généralement faible. Ce sont des substrats-suicide qui se lient de manière irréversible à la β -lactamase, empêchant l'action de celle-ci sur les β -lactamines. Ceci explique pourquoi les inhibiteurs des β -lactamases, en particulier l'acide clavulanique et le tazobactame, ne sont généralement pas utilisés seuls, mais en association avec un antibiotique comme l'amoxicilline, la ticarcilline ou la pipéracilline. Le sulbactame possède, en plus de son effet inhibiteur irréversible sur les β -lactamases, une activité antibiotique intrinsèque sur quelques espèces bactériennes comme *Acinetobacter baumannii*. Malgré leur intérêt en pratique médicale, les inhibiteurs des β -lactamases ne permettent pas d'inactiver l'ensemble des β -lactamases produites par les bactéries.

Chapitre 4 : La Résistance bactérienne (Yvon Michel-Briand, 2009)

La résistance bactérienne se définit comme la capacité de continuer à croître ou à survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant. Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance et suivant son caractère inné ou acquis : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle est programmée sur le génome et constante à l'intérieur du taxon ; elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce. Les résistances acquises sont quant à elles consécutives à des modifications de l'équipement génétique.

1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est essentiellement due à la présence de gènes chromosomiques ; elle est donc commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle peut être due à des particularités structurales s'opposant à l'action de l'antibiotique sur sa cible comme la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif les rendant naturellement résistantes aux antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les

glycopeptides. Elle peut être aussi due à des particularités métaboliques spécifiques : le bacille de la tuberculose par exemple n'est sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques en raison de son métabolisme original. La résistance naturelle peut enfin être médiée par l'expression constitutive ou induite d'une enzyme d'inactivation ou par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis à vis de l'antibiotique.

Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce ; elle détermine le niveau de sensibilité « basal » des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce. C'est la résistance de classe. Elle est constitutive et touche toute une famille d'antibiotiques.

2. Résistance acquise (Yvon Michel-Briand, 2012)

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition « de novo » de gènes de résistance exogènes.

La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'évènements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaines leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu. L'évolution des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et notamment aux β -lactamines illustre parfaitement ce phénomène. (Weiler and Corti, 2014).

3. Supports génétiques de la résistance (EARS-Net, 2011).

L'intérêt suscité par les enjeux liés à la résistance aux antibiotiques a mené de plus en plus de chercheurs à travailler sur le sujet, aboutissant à la découverte de nombreux mécanismes d'adaptation bactérienne. Parmi les modalités d'acquisition de la résistance aux antibiotiques, le transfert horizontal de gènes est un élément-clé. Ce type de transfert a probablement lieu dans tous les écosystèmes terrestres colonisés par les bactéries (Gallardo et al., 2003). Ainsi ces transferts ont été mis en évidence dans de nombreux écosystèmes, tels les sols, les rivières, les environnements marins, mais aussi les tubes digestifs d'insectes ou de mammifère. Différents éléments génétiques sont impliqués dans ce transfert de gènes (Coutinho et al., 2014).

3.1. Le chromosome (Steven et al, 2013)

3.1.1. Resistance naturelle

Le chromosome bactérien est porteur des informations génétiques nécessaires à l'existence même de la bactérie et contient aussi les gènes responsables de sa résistance naturelle intrinsèque (liée à sa structure ou à son métabolisme). Les gènes de résistance codant pour des enzymes d'inactivation ou des systèmes d'échappement s'expriment de façon constitutive lorsqu'ils sont portés par le chromosome conférant les caractères de résistance naturelle de la bactérie. (Aboumarzouk, 2014).

3.1.2. Resistance acquise

La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation. La fréquence de ces mutations est faible et variable (10^{-6} à 10^{-9}) mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler. La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurelle responsable de la résistance ; elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale. En absence d'antibiotiques dans le milieu exerçant une pression de sélection, la plupart des mutants naturels vont disparaître (Saravanan and Raveendaran, 2013).

3.2. Les éléments génétiques mobiles

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégron (Bennett, 2008) ;(Martinez, 2009) ;(Walsh, 2006).

3.2.1. Les plasmides (Snyder et al, 2013)

Les plasmides bactériens revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique. (Arlet G, 2006).

3.2.2. Séquences d'insertion et transposons (Prescott et al, 2003)

Les séquences d'insertion, aussi appelées éléments IS, sont de courtes séquences d'ADN (0,2 à 6 kpb) qui portent uniquement le gène codant pour la protéine responsable de la transposition, la transposase, et les sites reconnus par cette enzyme. Ces sites sont des séquences inversées répétées situées à chaque extrémité de la séquence d'insertion. Généralement d'une taille de 15

à 25 pb, elles varient de manière à ce que chaque type d'IS ait des séquences inversées répétées caractéristiques.

Contrairement à d'autres mécanismes qui réorganisent l'ADN, la transposition de ces éléments génétiques ne requiert pas de régions d'homologie étendues pour que la recombinaison puisse s'effectuer. Ces éléments transposables jouent un rôle très important dans l'évolution des bactéries puisqu'ils sont à l'origine de multiples réarrangements de leur génome. Les transposons (2-20 kpb) sont composés de séquences d'ADN qui fonctionnent comme des sites de recombinaison et de gènes codants pour des protéines qui participent à la réaction de recombinaison. Les sites de recombinaison sont situés aux deux extrémités du transposon et organisés en séquences inversées répétées. La taille de ces répétitions inversées terminales varie entre 25 et quelques centaines de paires de bases. Les sites de recombinaison ne sont pas des répétitions exactes et portent les séquences de reconnaissance des transposases.

3.2.3. Les intégrons

Les intégrons, plus récemment décrits vers la fin des années 80, jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment chez les bactéries à coloration de Gram négative. Aujourd'hui, alors que l'implication des intégrons dans l'adaptation bactérienne au-delà de la résistance aux antibiotiques est avérée, le rôle d'une partie de ces intégrons, parfois nommés intégrons de résistance (IR), est majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques et notamment chez des souches d'intérêt clinique (Naas et al., 2001) ;(Cambray et al., 2010).

4. Mécanismes de la résistance (Yvon Michel-Briand, 2012)

Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques est apparu rapidement après leur introduction en thérapeutique avec comme conséquence une diminution d'activité voire une inefficacité totale des molécules habituellement actives. Aujourd'hui le risque d'échec thérapeutique, la variété des résistances, la vitesse de leur évolution ainsi que leur capacité de dissémination sont des paramètres majeurs à prendre en compte dans la lutte contre ce phénomène. Trois mécanismes essentiels président aux «stratégies de la résistance bactérienne». Tous permettent à la bactérie de se soustraire à l'action de l'antibiotique présent dans le milieu et peuvent s'observer séparément ou de manière concomitante. Ce sont les stratégies de « désarmement, de blindage ou d'échappement », terminologie imagée parfois retrouvée dans la littérature. Les deux premiers mécanismes tendent à diminuer l'efficacité de la molécule en minimisant sa concentration aux abords directs de la bactérie ou

dans l'espace péri plasmique. Cet objectif est rempli aussi bien par la destruction de la molécule que par la modification de structures particulières (porines) aboutissant à minimiser la pénétration de l'antibiotique ou même à le rejeter (pompes d'efflux actif). (Ares et al., 2014).

4.1. Désarmement

Le désarmement consiste en la destruction de la molécule ou en son inactivation supprimant ainsi l'interaction avec sa cible. C'est l'expression d'enzymes spécifiques d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques qui permet leur destruction ou leur modification. Ce mode de résistance est très répandu dans le monde bactérien et touche essentiellement deux familles d'antibiotiques majeures qui sont les lactamines (lactamases) et les aminosides.

4.2. Blindage

Le blindage permet de soustraire la cible de l'antibiotique à son action sans détruire la molécule mais en diminuant sa concentration aux abords direct de la cible. Deux mécanismes principaux permettent d'atteindre ce but.

4.2.1. La diminution de perméabilité

L'imperméabilisation est un phénomène observé chez les bactéries à coloration de Gram négative. La structure même de leur paroi et plus particulièrement la présence d'éléments dédiés à la pénétration de molécules exogènes est à l'origine de ce type de résistance. La perméabilité membranaire intervient dans le contrôle de la concentration de différentes classes d'antibiotiques comme les β -lactamines ou les quinolones *via* l'expression des porines ou des transporteurs-pompes (Nikaido, H., 1996) ; (Hancock, 1997).

Les structures en cause sont les porines (Omp ou Opr) qui sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques (Figure 3). Le dysfonctionnement ou la perte de l'une d'entre elles peut entraîner une augmentation de CMI d'un facteur 4 à 8 de divers antibiotiques comme β -lactamines, acide nalidixique (NA), triméthoprime (TMP), fosfomycine, tétracycline (TE). La régulation rapide de l'expression de la porine d'*E. aerogenes* a été montrée chez un patient traité par l'imipénème. La prise de cet antibiotique s'accompagne de la disparition de la porine associée à la résistance de la souche aux β -lactamines, alors que l'arrêt du traitement entraîne sa réapparition chez la bactérie, redevenue sensible (Bornet et al., 2000). Dans plusieurs bactéries, la disparition des porines fait intervenir l'opéron *mar*, qui, *via* le petit ARN anti sens *micF*, déstabilise l'ARNm de la porine et ce, conjointement à l'expression des pompes d'efflux (Alekhshun and Levy, 1999) ;(Delihis and Forst, 2001). Le système d'osmorégulation à deux composants *ompR*-

envZ, qui règle l'expression de OmpC-OmpF chez *E. coli*, pourrait également jouer un rôle dans des isolats résistants (figure 2).

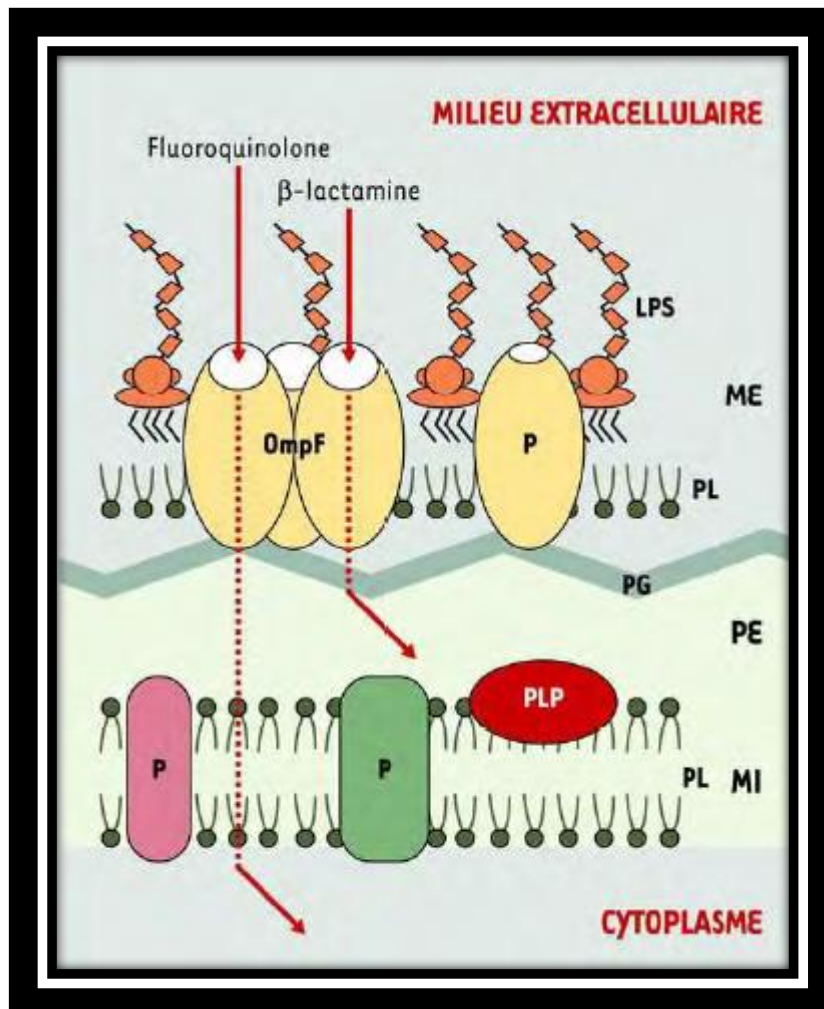


Figure 2. Enveloppe d'*Escherichia coli* (Alpha Amadou DIALLO, 2013)

P: protéines; PG: peptidoglycane; PLP: protéine de liaison aux pénicillines.

4.2.2. Efflux actif (Quale et al., 2006)

Les systèmes d'efflux actifs sont constitués de protéines transmembranaires capables de transporter activement du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur une variété de substrats suivant le type de pompe impliquée. On note que si la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative s'oppose à la pénétration de grosses molécules ou de molécules hydrophobes nocives, elle constitue également un obstacle pour les systèmes d'efflux de ces bactéries.

4.3. Camouflage

Le mécanisme de la résistance par « camouflage » se manifeste par une diminution de l'affinité entre la cible et son antibiotique consécutive à la modification de ladite cible (Lambert, 2005) ;(Martinez and Baquero, 2000). Ce mode de résistance touche plusieurs classes d'antibiotiques et notamment les β - lactamines, les quinolones et les macrolides respectivement par modification des protéines liant les pénicillines ou PLPs, des gyrases ou des ribosomes bactériens.

4.4. L'induction de résistance (Yvon Michel-Briand, 2009)

La résistance est dite « résistance inductible » lorsque la présence de l'antibiotique est nécessaire à l'expression de cette résistance. Bien qu'inductible, la résistance peut être considérée comme naturelle si son expression est constante ; il est à noter que certaines résistances acquises peuvent également nécessiter une induction pour s'exprimer.

5. Le cas des β -lactamines

Les différents mécanismes de résistance aux β -lactamines peuvent s'exprimer seuls ou de façon concomitante agissant alors de façon synergique. Il peut s'agir d'une diminution d'affinité de la cible, d'une diminution de la perméabilité de la membrane, de l'expression d'une pompe d'efflux actif ou de la production d'enzyme de type β - lactamase.

5.1. Modification des protéines de liaison a la pénicilline (PLP)

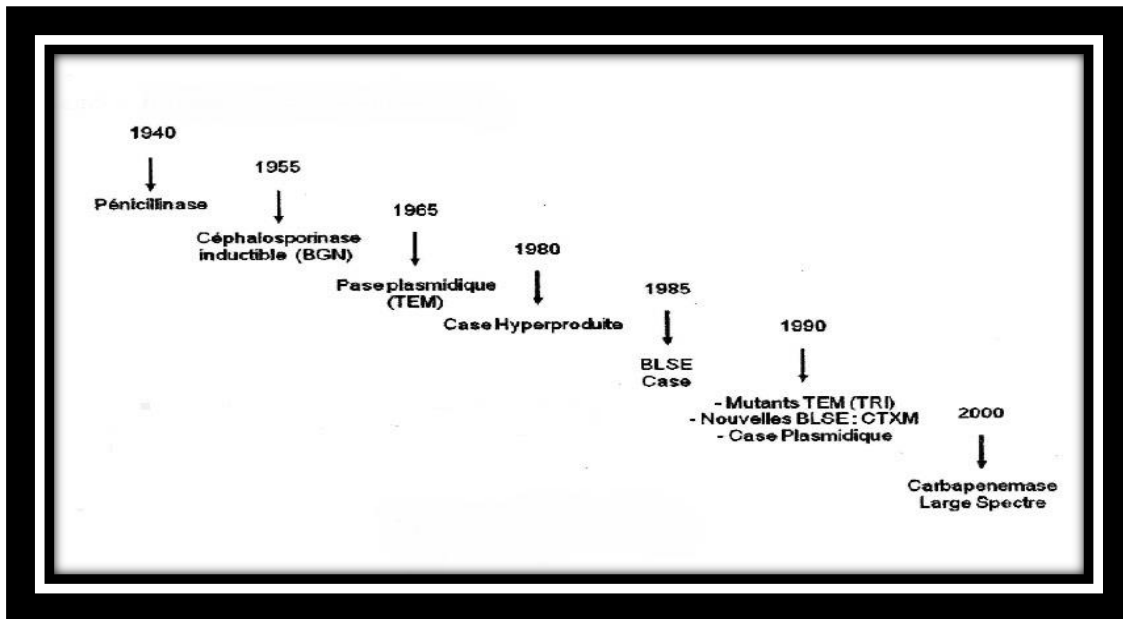
Ces PLP modifiées présentent une affinité plus faible pour les β -lactamines. Elles sont relativement résistantes à l'inactivation par les pénicillines et sont capables de remplir les fonctions des PLP lorsque ces dernières sont inactivées. Ce mécanisme de résistance est majeur pour les bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et les entérocoques (Zapun et al., 2008) .

5.2.Systèmes d'efflux actif

Les systèmes d'efflux éliminent activement les β -lactamines dans le milieu extérieur en utilisant la force proton-motrice. Ainsi, ils diminuent la concentration d'antibiotique au contact de sa cible et donc son efficacité. Ce type de mécanisme de résistance a été mis en évidence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Poole, 1994) ;(Li et al., 1994).

Chapitre 5 : Les β -lactamases

1. Historiques sur les β -lactamases



2. Production de β -lactamases

C'est le mécanisme qui nous intéresse le plus dans notre étude. Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent la fonction amine du cycle β -lactamine et qui rendent l'antibiotique inactif avant qu'il n'atteigne sa cible : les « protéines de liaison à la pénicilline » (PLP). La parenté structurale que les β -lactamases partagent avec les PLP leur permet de lier, acétyler et hydrolyser donc inactiver les β -lactamines (**Massova and Mobashery, 1998**).

Les β -lactamases sont exportées dans le milieu extracellulaire (bactéries à coloration de Gram positive telles que *Staphylococcus aureus*) ou péri-plasmiques (bactéries à coloration de Gram négative). Plus de 500 β -lactamases ont été répertoriées (**Babic et al., 2006**). La destruction des β -lactamines par les β -lactamases est le mécanisme de résistance majeur des bactéries à coloration de Gram négative. Afin d'augmenter son taux d'hydrolyse, une cellule peut exprimer le gène de la β -lactamase sous le contrôle d'un promoteur fort, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse de l'enzyme (**Spencer et al., 1987**). La dissémination de ces caractères de résistance représente un risque accru pour la population. Les gènes de résistance sont souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles, *e.g.* des plasmides et des transposons, et le transfert de ce matériel chez les bactéries n'est pas limité à une espèce en particulier (**Bauernfeind and Hörl, 1987**).

La production de β -lactamases est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif. Ces enzymes, qui sont apparentées aux protéines liant la pénicilline (PLP), hydrolysent le cycle β -lactame des β -lactamines et inactivent ces dernières.

Les β -lactamases, dont le support génétique peut être chromosomique ou plasmidique, sont produites à l'état de précurseur dans le cytoplasme et deviennent matures en perdant leur peptide signal lors de leur transfert à travers la membrane cytoplasmique. Comme elles ne peuvent pas franchir la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elles restent concentrées dans l'espace péri-plasmique où elles inactivent les β -lactamines avant que ces dernières n'atteignent leur cible.

2.1. Classification des β -lactamases

Au vu du nombre élevé de β -lactamases et de la diversité de ces enzymes, plusieurs classifications ont été proposées. Deux d'entre elles sont actuellement utilisées : la classification structurale proposée par Ambler et la classification fonctionnelle de Bush quant aux autres classifications, elles ne sont pas couramment utilisées (**Ghafourian et al., 2014**).

2.1.1. La classification de Ambler

En 1980, Ambler a proposé une classification basée sur la structure primaire des β -lactamases, selon cette classification, il existe quatre catégories définies selon leur spectre enzymatique (**Ambler et al., 1991**).

Les classes A, C et D sont composées d'enzymes à sérine active et se différencient les unes des autres par les séquences des éléments conservés du site actif. Les enzymes de classes B (ou métallo-enzymes, métallo- β -lactamases) se caractérisent par l'absence de site sérine active et la présence d'un ou deux atomes de zinc au niveau du site actif.

1- la classe A : (pénicillinasés de type sérine protéases, inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam), comme les principales CTX-M BLSE, les nouvelles carbapénémases KPC

2- la classe B : (métalloenzymes, dont le site actif contient au moins un ion zinc, résistantes à l'acide clavulanique mais inhibées par l'EDTA), comme certaines carbapénémases ;

3- la classe C : (céphalosporinasés insensibles à l'acide clavulanique mais inhibées par la cloxacilline), comme les céphalosporinasés de type *AmpC*

4- la classe D : (oxacillinasés hydrolysant la cloxacilline et peu inhibées par l'acide clavulanique), constituant une famille extrêmement composite en termes de spectre d'hydrolyse

Bien qu'elle ne reflète pas bien la réelle diversité génétique et phénotypique des β -lactamases, cette classification a l'avantage d'être simple et stable dans le temps.

2.1.2. La classification fonctionnelle de Bush et Jacoby

La classification fonctionnelle des β -lactamases a été élaborée en 1989 et réactualisée à deux reprises, en 1995 et 2010 (**Bush et al., 1995**) ; (**Bush and Jacoby, 2010**) Cette classification permet de classer les enzymes en 15 groupes sur la base de leur profil de substrat et de leur sensibilité à l'action inhibitrice du clavulanate, du tazobactam et de l'EDTA.

Les groupes 1 et 1e regroupent les enzymes de la classe C de Ambler, (ou céphalosporinases codées par les gènes *ampC*), qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Les enzymes qui appartiennent au groupe 1e dérivent le plus souvent des céphalosporinases chromosomiques par mutations ponctuelles et possèdent un profil de substrat étendu aux céphalosporines de 3ème génération.

Les groupes 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2e et 2f rassemblent les enzymes à sérine active de la classe A de Ambler et témoignent de la diversité phénotypique retrouvée au sein de cette classe :

- le groupe 2a comprend les pénicillinases à spectre étroit qui sont inhibées par l'acide clavulanique et qui sont principalement décrites chez les bactéries à Gram positif.
- le groupe 2b est constitué des β -lactamases à large spectre qui sont inhibées par l'acide clavulanique.
- le groupe 2be regroupe les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui sont inhibées par l'acide clavulanique.
- le groupe 2br comprend les β -lactamases à large spectre qui résistent à l'action des inhibiteurs comme l'acide clavulanique et le tazobactame. Ces enzymes peuvent dériver des pénicillinases de type TEM (elles sont alors nommées TRI, TEM résistantes aux inhibiteurs) ou de type SHV.
- le groupe 2ber est constitué de variantes BLSE de type TEM, encore appelés CMT (Complexe Mutant TEM) car ils sont peu sensibles à l'action de l'acide clavulanique.
- le groupe 2c est composé des carbénicillinases, enzymes qui hydrolysent efficacement la carbénicilline et la ticarcilline et qui sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactame.
- le groupe 2e regroupe les céphalosporinases qui sont inhibées par l'acide clavulanique.
- le groupe 2f comprend les carbapénémases qui sont inhibées par l'acide clavulanique les enzymes des groupes 2d, 2de et 2df correspondent aux β -lactamases de la classe D de Ambler qui hydrolysent efficacement les pénicillines M (oxacilline, cloxacilline) et qui sont communément appelées oxacillinases (ou OXA).
- Le groupe 2d comprend les β -lactamases hydrolysant la cloxacilline (oxacillinases).

- Le groupe 2de est constitué de BLSE de type OXA dont le profil de substrats est étendu aux céphalosporines de 3ème génération, à l'aztréoname et parfois aux céphalosporines de 4ème génération.

- Le groupe 2df regroupe les oxacillinasés ayant une activité sur les carbapénèmes.

Les enzymes des groupes 3a et 3b correspondent aux métallo- β -lactamases (classe B de Ambler), enzymes qui hydrolysent les carbapénèmes, qui résistent à l'action de l'acide clavulanique et du tazobactame mais qui sont inhibées par l'EDTA.

Contrairement aux enzymes du groupe 3b, les β -lactamases du groupe 3a ont un profil de substrat large qui ne se limite pas aux carbapénèmes, mais inclut toutes les β -lactamines, à l'exception des monobactames.

La classification proposée par Bush et Jacoby rend donc compte de la diversité fonctionnelle des β -lactamases, y compris au sein d'une même famille d'enzyme. Ainsi, la survenue de mutations ponctuelles sur le gène *bla* TEM a conduit à la formation de nombreuses variantes protéiques qui sont classés dans quatre groupes fonctionnels différents (2b, 2be, 2br et 2ber). (Jacoby, 2009) ,(Gupta et al., 2012).

2.1.3. Classification de Richmond-Sykes

Basée sur les propriétés fonctionnelles de l'enzyme définies par son substrat préférentiel (Ingram et al., 1973). Grâce aux banques de données qui donnent accès aux séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques, il est désormais possible de relier ces trois classifications. Les comparaisons de ces séquences peptidiques ont également montré l'existence de motifs ou éléments (séquences courtes en acides aminés) souvent conservés ou partiellement dégénérés, communes ou propres à chaque classe de β -lactamases A, C et D (Vanhove et al., 1995) (Matagne et al., 1998).

3. Réaction enzymatique

Les β -lactamases à sérine active (classes A, C et D) sont comme les PLPs, membres de la famille des penicilloyl sérine transférases qui catalysent le clivage de la liaison amide du cycle β -lactame par l'intermédiaire de leur sérine active. Le mécanisme d'inactivation des β -lactamines est décrit comme suit :

La réaction d'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame suit trois étapes :

- Reconnaissance du substrat : L'enzyme (E) reconnaît une β -lactamine (S) pour former un complexe non covalent (E-S) dit de Michaëlis-Menten.

- Acylation de l'enzyme : attaque nucléophile d'ouverture du cycle β -lactame par le groupement hydroxyle de la sérine active. La sérine active se fixe sur le carbonyle du cycle β -lactame, pour former un complexe acyl-enzyme covalent (E-S').
- Dés-acylation : hydrolyse rapide de l'acyl-enzyme, formation de composés acides tels que le pénicilloïque ou le céphalosporoïque qui sont inactifs (P) et restitution de l'enzyme (E) (**Bush and Sykes, 1986**); (**Joris et al., 1986**)

Pour les enzymes de classe B qui dégradent plus particulièrement l'imipénème, elles utilisent les ions Zn^{2+} au lieu du radical hydroxyle de la sérine active. Il y a donc formation d'un complexe non covalent, sans intermédiaire acyl-enzyme.

4. Structure protéique des β -lactamases à sérine active

Les enzymes de classe A, C et D possèdent une sérine (S) dans leur site actif. En position 64 pour la classe C et 70 pour les classes A et D, et est toujours suivie, trois acides aminés plus loin par une lysine (K). L'analyse des séquences des β -lactamases met en évidence autour du site actif des résidus conservés de nature identique ou de fonction semblable entre les enzymes des classes A, C et D et les PLPs (motifs KTG, SDN, YAN ou YGN)

Les β -lactamases et les PLPs ont une structure tridimensionnelle très proche, dite en ruban. Elles sont formées par la juxtaposition d'un domaine en hélice α et d'un domaine comportant des hélices α et des feuillets β , à la jonction desquels se trouve le site actif (**Chandramohan and Revell, 2012**); (**Anderson et al., 2003**).

5. Les β -lactamases à Spéctre Elargi (BLSE)

Ces enzymes possèdent un spectre de substrat large qui comprend les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème et de 3ème génération ainsi que l'aztréoname, mais qui épargne les céphamycines et les carbapénèmes. La très grande majorité des BLSE sont des enzymes de la classe A de Ambler qui sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactame.

Cette propriété se manifeste par une synergie entre les céphalosporines de 3ème et 4ème génération ou l'aztréoname et l'acide clavulanique. C'est sur ce phénomène de synergie que repose les différentes techniques de détection des BLSE de classe A, le plus courant étant la recherche d'une « image de synergie » entre un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (ou céphalosporine de 4ème génération, ou aztréoname) et un disque contenant de l'acide clavulanique. Cette « image de synergie » (figure 3) correspond à l'élargissement de la zone

d'inhibition entre ces disques et peut prendre l'aspect d'un « bouchon de champagne » (ou « entonnoir », d'une ellipse ou d'une « image fantôme »

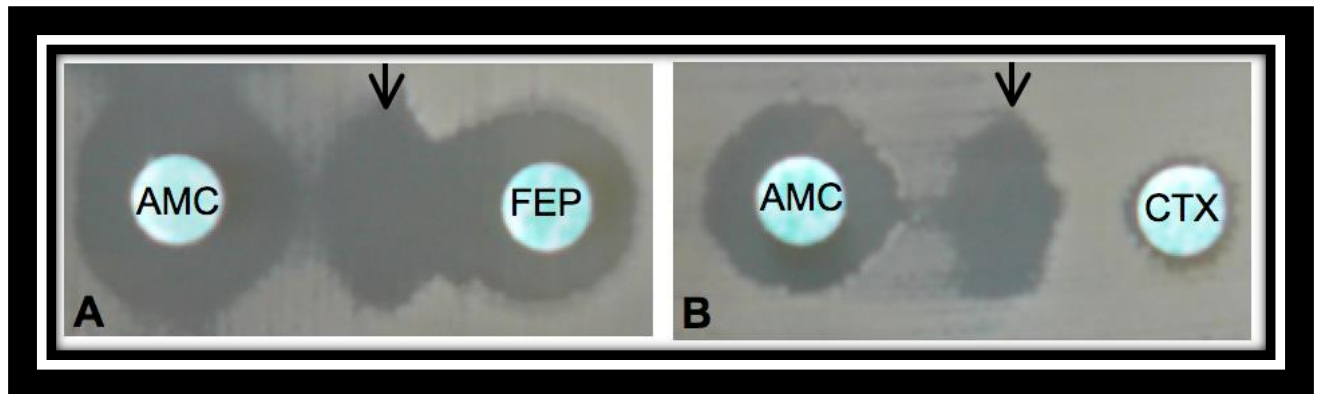


Figure 3. Images de synergie (Laurence Drieux, 2012).

A. image en « bouchon de champagne » entre un disque imprégné d'amoxicilline-clavulanate (AMC) et un disque imprégné de céfépime (FEP). **B.** image en « ellipse » entre un disque imprégné d'amoxicilline-clavulanate (AMC) et un disque imprégné de céfotaxime (CTX).

5.1. Détection des BLSE par les Techniques microbiologiques

Les méthodes utilisent les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique, en combinaison avec les oximino- β -lactamines tels ceftazidime ou cefotaxime.

Le principe de ces méthodes est que le clavulanate inhibe les BLSE et ainsi réduit le niveau de la résistance aux céphalosporines (**Bradford, 2001**).

La plupart des tests de détection de BLSE sont basés sur la méthode de diffusion de Kirby-Bauer. Ainsi plusieurs méthodes ont été décrites parmi lesquelles, le test de double synergie, la méthode de confirmation du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), le test à trois dimensions, les tests commerciaux.

5.1.1. Test de double synergie (Jarlier et al., 1988)

Entre un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération ou aztréoname un inhibiteur de β -lactamase tel l'acide clavulanique est l'un des premiers tests à être décrit. C'est le test le plus utilisé et le plus recommandé. Ce test possède plusieurs variantes et est basé sur la mise en évidence d'une restauration de l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération ou de l'aztréoname en présence d'un inhibiteur enzymatique. Le test synergie peut être insensible pour plusieurs raisons : la distance entre les disques, l'inaptitude des inhibiteurs à inhiber toutes les β -lactamases (céphamycinases qui ne sont pas inhibées par exemple) et l'inaptitude

du test de détecter la présence de BLSE (montrer l'image de synergie chez les souches productrices des céphalosporines chromosomiques).

Malgré ces défaillances, c'est une méthode assez utilisée en routine car elle ne nécessite pas beaucoup de matériel et est de réalisation facile.

5.1.2. Interprétation de la faible diminution de la sensibilité

Cette interprétation se fait selon des souches vis-à-vis des céphalosporines de 3^{ème} génération et de l'aztréoname, ce n'est pas une méthode assez fiable car la diminution de la sensibilité peut impliquer un mécanisme de résistance autre que la production de BLSE (Thomson and Sanders, 1992).

5.1.3. Test de trois dimensions (Thomson and Sanders, 1992)

Permet non seulement d'avoir les informations sur le profil des β -lactamases, mais aussi sur la sensibilité de la souche vis-à-vis des antibiotiques utilisés. Cette méthode a une sensibilité élevée mais n'est pas de réalisation facile.

5.1.4. L'utilisation du disque de cefpodoxine (30 ug)

C'est une méthode qui permet de détecter les BLSE chez *E.coli* et *K.pneumoniae*. Ce disque n'est pas beaucoup utilisé par les laboratoires de microbiologie clinique (Thomson, 1995).

5.1.5. L'utilisation des disques de ceftazidim de 5ug

Elle est proposé par (Jacoby and Han, 1996) pour la détection des BLSE chez *E.coli* et *K.pneumoniae*. Les BLSE sont suspectées lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 18 mm. Ces auteurs proposent d'ajouter 20 μ g de sulbactame sur un disque d'oxymino-céphalosporine.

L'augmentation du diamètre d'inhibition de 5mm comparée au disque sans inhibiteur est signe de la production d'une BLSE.

5.1.6. L'utilisation de la méthode des disques (CLSI 2010)

Elle est proposée par Le CLSI pour rechercher la production de la BLSE par *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*.

Le test de confirmation par les disques utilisant les disques **BBL Sensi-Disk** (BD Bioscience, Sparks, Md). Ce test utilise la méthode de diffusion avec les disques de cefotaxime et de ceftazidime seuls et contenant de l'acide clavulanique. La BLSE est détecté lorsque le

diamètre d'inhibition de la combinaison céphalosporine/acide clavulanique est supérieure d'au moins 5mm à celui de la céphalosporine seule.

5.1.7. Les bandettes E-test

Pour la détection des BLSE (AB Biodisk, Solna,Sweden). Ces bandettes renferment sur un bout un gradient de ceftazidime ou de ceftoaxime et sur l'autre bout de la ceftazidime ou ceftoaxime avec l'acide clavulanique. Le test est positif lorsqu'on observe une réduction d'au moins 3 fois de CMI de la ceftazidime en présence de l'acide clavulanique. Ce test assez sensible (87-100%) et spécifique (95-100%) (**Cormican et al., 1996**) ; (**Brown et al., 2000**). Ce test est de réalisation facile mais il arrive que l'acide clavulanique diffuse du côté où la ceftazidime est seule, rendant difficile la lecture (**Vercauteren et al., 1997**). Ce test coûte cher et n'est pas à la portée des laboratoires des pays en développement.

5.1.8. Le test de Vitek

Pour BLSE (bioMérieux, Vitek ,Hazelton, Missouri) la carte Vitek pour BLSE utilise la ceftazidime ou le cefotaxime seul (0,5µg/ml) et en combinaison avec l'acide clavulanique (4µg/ml). La réduction de la croissance dans les puits contenant l'acide clavulanique comparée à ceux contenant les céphalosporines seuls indique la présence de BLSE. La sensibilité et la spécificité de ce test sont supérieures à 90% (**Sanders et al., 1996**).

D'autres systèmes automatisés tels **Dade Behring Microscan** (Sacramento,Calif) et le système microbiologique automatisé **BD phoenix de Becton Dickinson Biosciences** (Sparks, Md) sont aussi capables de détecter les BLSE.

Sur ces tests commerciaux (**Linscott and Brown, 2005**) ont montré que leur sensibilité variait de 96% (BBL sensi –Disk) à 100% (Micro scan) et leur spécificité de 94% (E-test) à 100% (BBL sensi-Disk).

La plupart de ces tests visent à détecter la production des BLSE par *E.coli*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* (**Pitout et al., 2003**).

A ces techniques basées sur l'antibiogramme, il existe d'autres utilisant les méthodes moléculaires.

5.2. Techniques moléculaires

L'utilisation de techniques de biologie moléculaire telles que « *la polymérase Chain réaction* » (PCR) multiplex ou la spectrométrie de masse, devrait permettre d'améliorer la sensibilité de détection des microorganismes par rapport aux techniques de culture, de diminuer le délai de rendu des résultats à quelques heures et de raccourcir ainsi la durée de traitement par des antibiotiques à large spectre (**Bauer and Reinhart, 2010**).

Un avantage important de ces techniques est aussi la détection plus rapide des microorganismes multi résistants qui sont de plus en plus fréquemment responsables d'infections chez les patients septiques (**Pletz et al., 2011**) ainsi, le diagnostic de sepsis reste difficile avec les moyens actuellement disponibles.

5.3. Classification phylogénétique des BLSE

En fonction de leur séquence en acides aminés, ces enzymes ont été classées dans 11 familles (figure 4).

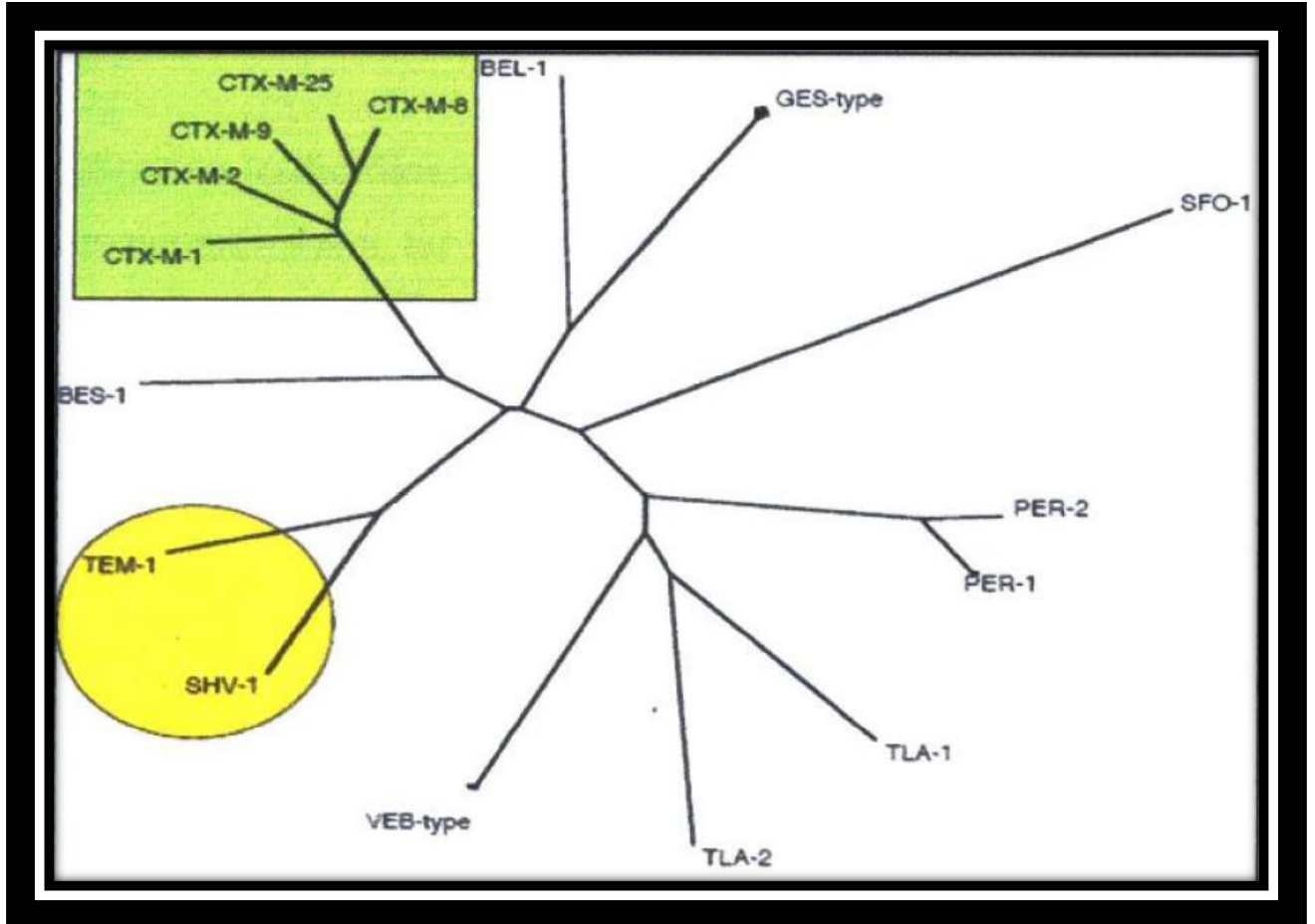


Figure 4. Classification phylogénétique des BLSE D'après (Arlet G, 2006).

Dans la suite de l'étude bibliographique, nous allons nous focaliser sur les trois grandes familles de BLSE de type TEM, SHV et CTX-M illustrées en couleur dans la figure 4 de la classification phylogénétique des BLSE.

5.4. Diversité des types de BLSE

5.4.1. Les BLSE de type TEM et SHV

Les BLSE de type TEM et SHV dérivent des pénicillinases TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 par des mutations qui modifient la configuration du site actif de l'enzyme et entraînent un élargissement du spectre de substrat aux céphalosporines de 3ème génération et à l'aztréoname.

Les principales mutations responsables du phénotype BLSE, chez les β -lactamases de type TEM, surviennent aux positions 238 (Gly-ser), 240 (Glu-Lys), 104(Glu-Lys) et 164 (Arg-Ser ou Arg-His) (**Bradford, 2001**).

A l'heure actuelle, les variantes BLSE de type TEM les plus fréquemment retrouvées au sein de cette famille sont TEM-24, TEM-52 et TEM-4 (**Coque et al., 2008**). (**Figure 5**)

Au sein de la famille des β -lactamases de type SHV, les mutations les plus fréquemment impliquées dans le phénotype BLSE surviennent aux positions 238 (Gly-ser) et 240 (Glu-Lys). Les variantes BLSE de type SHV les plus fréquentes à l'heure actuelle, sont SHV-12 et SHV-5 (**Coque et al., 2008**). (**Figure 6**).

➤ BLSE type TEM

Les BLSE de type TEM dérivent de TEM-1, qui a été détecté pour la première fois sur un souche de *E. coli* isolée chez un patient à Athènes en Grèce en 1965 et de TEM-2. Elles comptent actuellement plus de 150 dérivés dont plus de 100 avec un phénotype BLSE. A noter que certains dérivés de TEM (environ 30) ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux IBL, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (**Bradford, 2001**). TEM-1, TEM-2 et TEM-13 qui ont une capacité d'hydrolyse limitée aux dérivés de pénicilline, ne sont pas considérés ainsi comme des BLSEs (**Livermore, 1995**). Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des Entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* (**Bradford, 2001**) ;(**Paterson and Bonomo, 2005**) (figure 5).

En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli* (**Cantón et al., 2008**).

➤ **BLSE de type SHV**

Tout comme les enzymes de type TEM, la majorité des enzymes SHV identifiées actuellement sont des BLSEs et dérivent toutes de SHV-1 et de SHV-2. La majorité des dérivés de SHV-1, plus de 60 dérivés, ont un phénotype BLSE, avec SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe (**Cantón et al., 2008**).

La résistance induite par SHV-1 est limitée aux pénicillines. Par contre, SHV-2, qui a été décrite pour la première fois en 1983 chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne, est capable d'hydrolyser le cefotaxime (**Gupta, 2007**). Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses Entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. (**Bradford, 2001**) ; (**Paterson and Bonomo, 2005**) (figure 6).

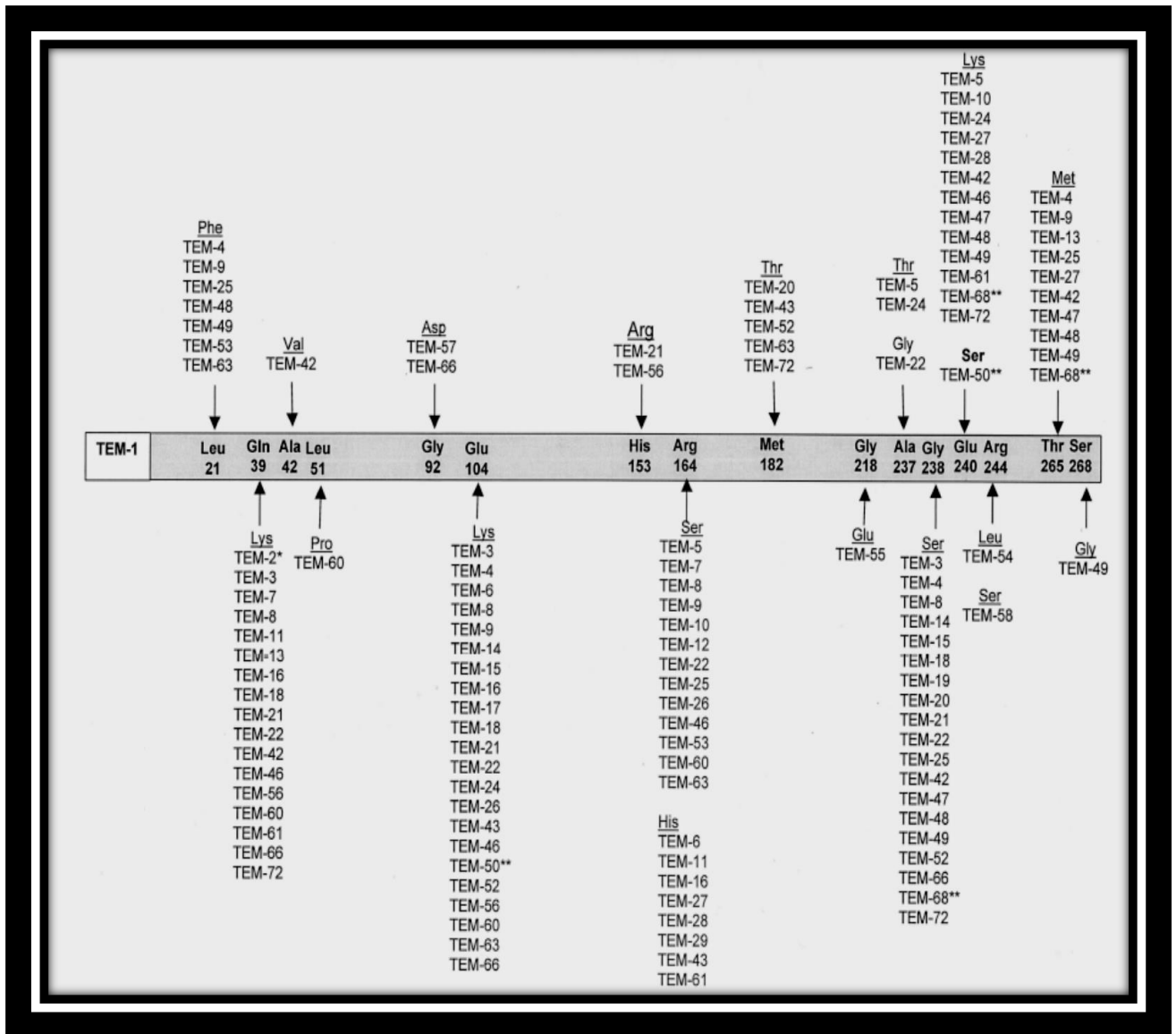


Figure 5. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type TEM (Bradford,2001). *variant pénicillinase ; **variant TRI.

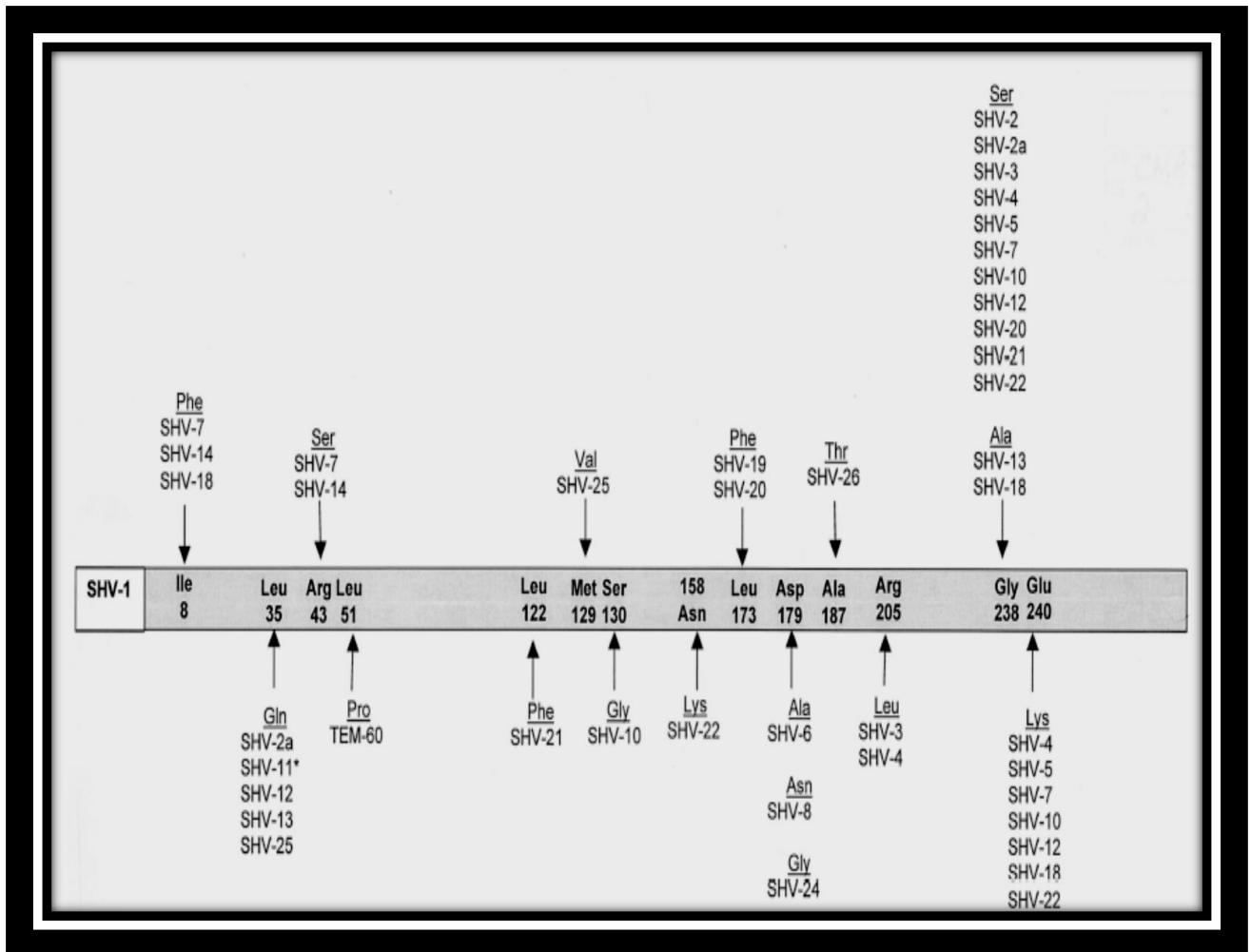


Figure 6. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type SHV.

(Bradford,2001). *variant pénicillinase.

5.4.2. Les BLSE de type CTX-M

La première description d'enzyme de type CTX-M date de 1986 au Japon. L'enzyme avait alors été baptisée TOHO-1, avant d'être rebaptisée CTX-M-44 quelques années plus tard (**Matsumoto et al., 1988**) ;(**Bonnet, 2004**)

Depuis le début des années 2000, l'épidémiologie mondiale des Entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) a complètement changé, avec l'émergence des enzymes de type CTX-M sur les 5 continents. Ces enzymes ont supplanté les enzymes qui étaient dominantes depuis l'apparition des BLSE en 1984, c'est-à-dire les BLSE dérivées par mutation des pénicillinases TEM-1, TEM-2 et SHV-1. (**Hernández et al., 2014**).

Ces enzymes représentent actuellement les BLSE les plus fréquentes au sein des Entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (**Livermore et al., 2007**). Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime parmi les C3G, d'où leur nom de céfotaximases (**Bonnet, 2004**).

En effet, les bactéries productrices de CTX-M sont résistantes au céfotaxime (CMI > 64 µg/mL) et plus ou moins sensibles à la ceftazidime (CMI de 2 à 8 µg/mL), tandis que les CMI de l'aztréoname sont variables (**D'Andrea et al., 2013**).

La proportion de souches sensibles aux céphalosporines de 3ème génération dans cette espèce a progressivement diminué au cours de la dernière décennie, comme le montrent les données nationales recueillies depuis 2002 dans le cadre du réseau européen de surveillance de la résistance aux antibiotiques 98,1% en 2002 vs 91,2% en 2010 (**EARS-Net, 2011**).

5.4.2.1. Spectre d'activité et classification des BLSE de type CTX-M

Les enzymes de type CTX-M sont des BLSE « naturelles » qui hydrolysent préférentiellement le cefotaxime (**Bonnet, 2004**), par rapport à la ceftazidime. Ce spectre d'activité est lié au fait que le site catalytique n'est pas accessible à la volumineuse molécule de ceftazidime, contrairement aux pénicillines, céphalosporines de 1ère et de 2ème génération et au cefotaxime. Sur le plan phénotypique, les souches peuvent alors apparaître sensibles à la ceftazidime. Un certain nombre de variantes CTX-M sont capables d'hydrolyser la ceftazidime à un plus haut niveau (ex : CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27). (**Réjiba et al., 2011**). (figure 7).

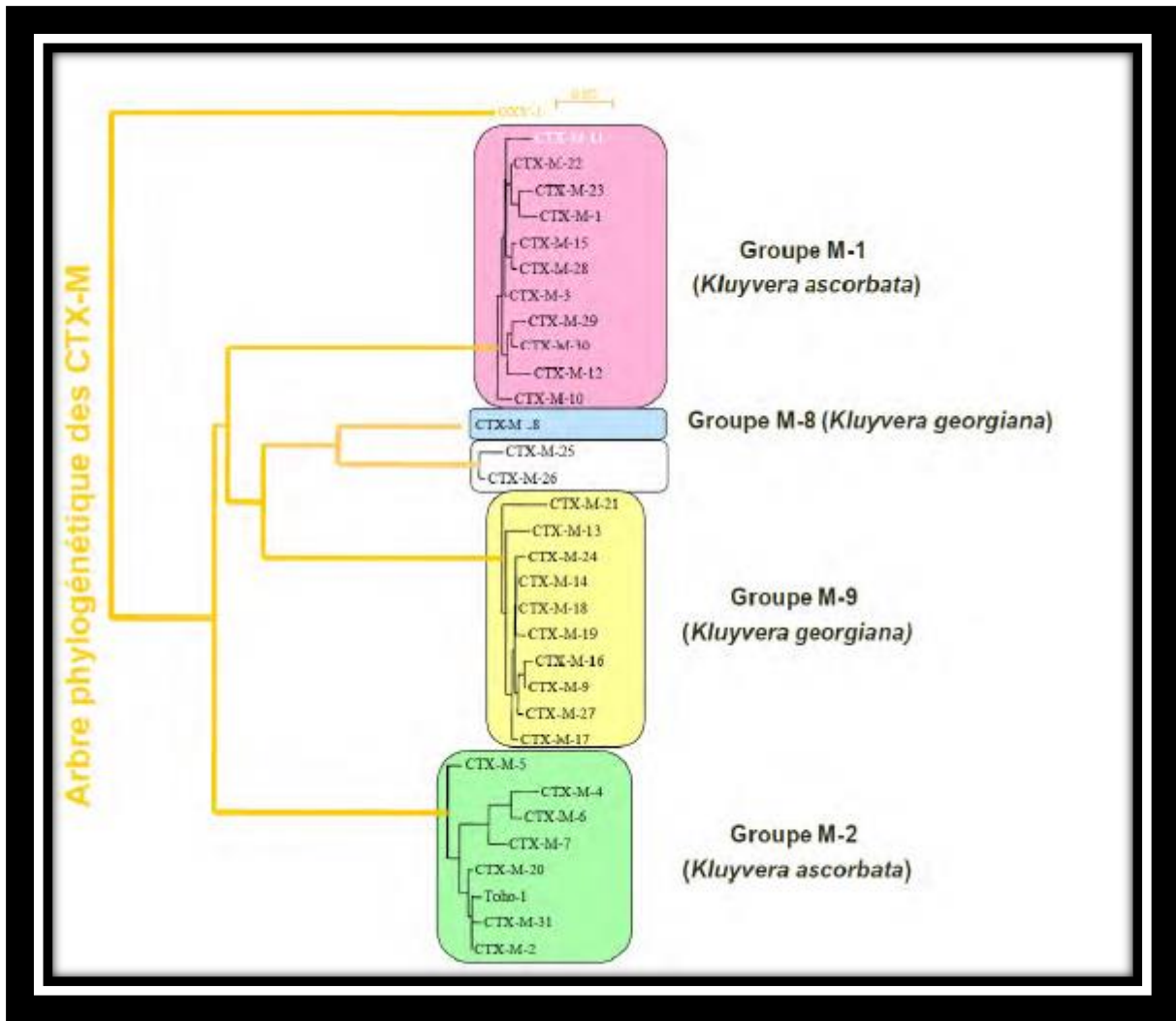


Figure 7. Schéma de l'arbre phylogénétique des CTX-M : Origine des gènes codant le groupe CTX-M (Arlet G, 2006).

5.4.2.2. Distribution géographique des BLSE de type CTX-M

La plupart des antibiotiques actuellement en service sont produits à partir de processus naturels par des bactéries du sol comme les streptomycètes. La présence de bactéries résistantes et des gènes de résistance dans l'environnement est un phénomène antique qui est la conséquence de l'origine des antibiotiques. Depuis leurs origines, les gènes ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles comme des séquences d'insertion (ex. *ISEcp1*, *ISCR1*) ou grâce à des phages, et transférés sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes pour l'homme (**Cantón et al., 2008**) ; (**Wang et al., 2013**).

Les souches productrices de CTX-M ont été initialement rapportées de façon sporadique à la fin des années 80 au Japon (FEC-1), en Europe (MEN-1, CTX-M-1) et en Argentine (CTX-M-2) (Figure 8). Dans le début des années 90, une diffusion massive des souches productrices de CTX-M (*Serratia enterica*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *E. aerogenes*) a été décrite en Argentine et dans les pays voisins, impliquant pour la plupart les CTX-M du groupe 2 (**Sennati et al., 2012**).

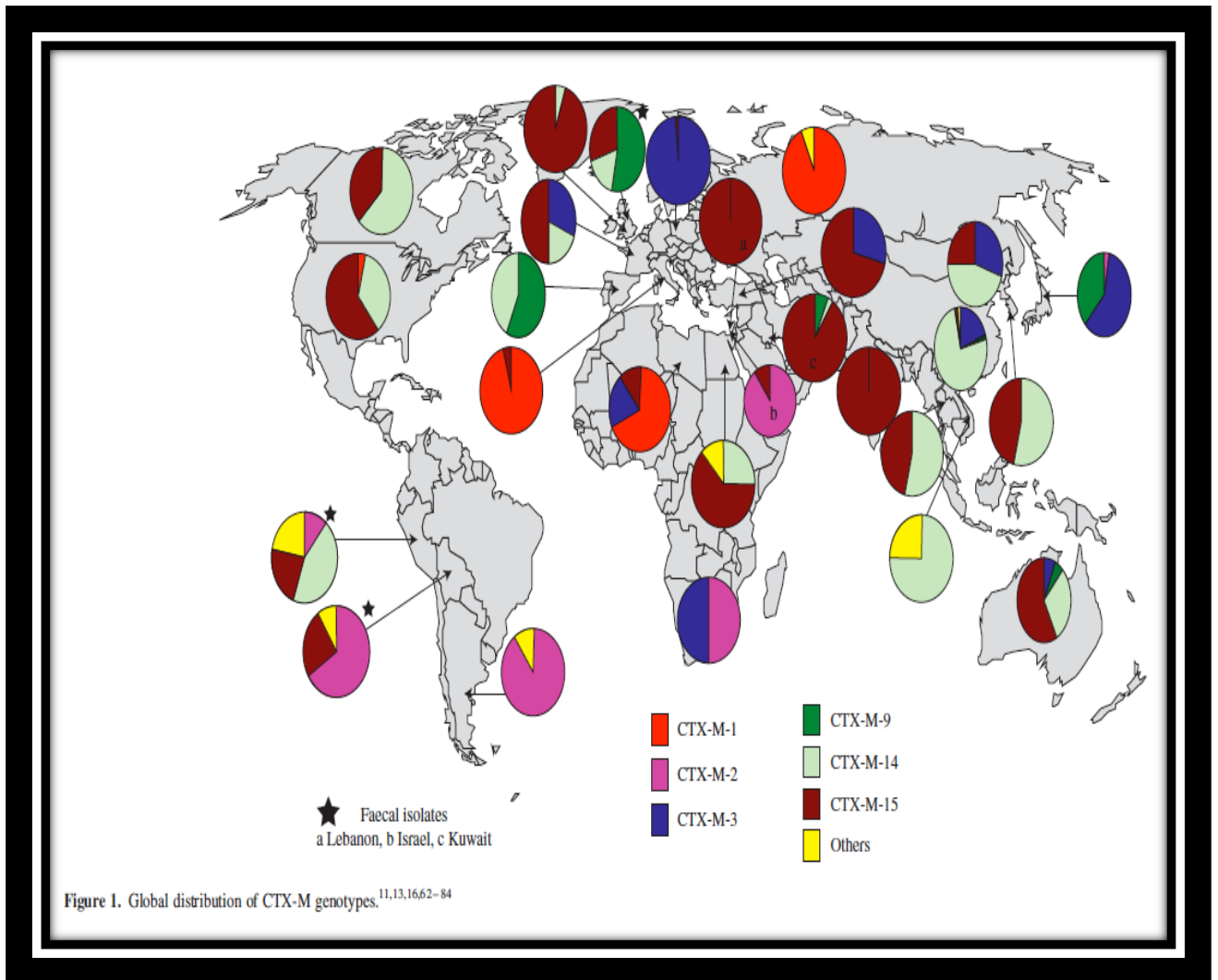


Figure 8. Répartition mondiale des différentes BLSE de type CTX-M.
 (Hawkey and Jones, 2009).

5.4.2.3.Support génétique et origine des BLSE de type CTX-M

Bien qu'ils puissent être localisés sur le chromosome, les gènes *bla*_{CTX-M} sont le plus souvent portés par des plasmides conjugatifs de taille variable, sur lesquels ces gènes sont fréquemment associés à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques (Coque et al., 2008). Les BLSE de type CTX-M proviennent de gènes chromosomiques retrouvés chez les bactéries du genre *Kluyvera*, (entérobactéries de l'environnement). Les enzymes de type CTX-M ont pour précurseurs des enzymes isolées de *Kluyvera ascorbata* pour les enzymes des groupes 1 et 2 (Humeniuk et al., 2002) ;(Rodríguez et al., 2004).

Ces précurseurs sont génétiquement très proches des enzymes CTX-M (ex, 98% d'homologie de séquence entre KLUG-1 et CTX-M-8 (Poirel et al., 2002) ; (Zhuo et al., 2013).

De multiples mécanismes génétiques sont probablement impliqués dans la capture et la dissémination des gènes *bla*_{CTX-M}, la séquence d'insertion *ISEcp1* et les intégrons complexes de classe 1 ayant joué un rôle majeur dans ces événements.(Eckert et al., 2004) ;(Poirel et al., 2003) ;(Poirel et al., 2005).

5.5.Epidémiologie des BLSE

Aux Etats-Unis, la prévalence des Entérobactéries productrices des BLSE varie de 0 à 25% avec une moyenne nationale de 3% (Center for Disease Control and Prevention national nosocomial Infections surveillance.

Au Canada, la prévalence de production de BLSE est faible de l'ordre de 0,25% pour *E.coli* et 0,8% pour *Klebsiella sp* (Mulvey et al., 2004).

En Europe la prévalence des BLSE chez les entérobactéries varie d'un pays à un autre, une étude récente portant sur *E. coli*, *K.pneumoniae* et *Enterobacter spp* a montré que la prévalence de BLSE est de 4,7% en Europe du Nord contre 13,5% au Sud de l'Europe (Bouchillon et al., 2004) ; (Fouquet et al., 2012).

Au Japon le pourcentage de résistance aux β -lactamines par production de BLSE chez *E.coli* et *K.pneumoniae* est assez faible. les travaux de (Yagi et al., 2000) ont montré que ce pourcentage est supérieur à 1% pour *E.coli* et 0.3% pour *K.pneumoniae*. dans d'autres régions de l'Asie, la proportion de *E.coli* et *K.pneumoniae* productrices de BLSE varie de 4,8% en Corée (Pai et al., 1999) à 8,5% au Taiwan (Yan et al., 2000) et supérieur à 12% à Hong Kong (Ho et al., 2000).

Depuis 2006 peu études ont été rapportées sur la production des BLSE chez les Entérobactéries en Afrique et principalement en Algérie (Labid et al, 2014).

L'incidence de la *K.pneumoniae* productrices de BLSE (BLSE KP) se situe entre 73% et 100% dans les pays suivants: Grèce, Hongrie, Lettonie, Roumanie, Bulgarie, et Macédoine,

par rapport à *E. coli* productrices de BLSE (BLSE CE), l'incidence varie entre 85% et 100% dans plus de la moitié des pays déclarants, y compris l'Allemagne, la France, la Belgique, le Danemark, la Norvège, la Finlande, l'Irlande, l'Espagne, le Royaume-Uni, l'Italie, le Portugal, la Grèce et l'Autriche (**EARS-Net, 2011**) (**Ghafourian et al., 2014**).

6. Les carbapénémases

Les enzymes qui possèdent une activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes appelées carbapénémases regroupent des enzymes qui appartiennent à trois des quatre classes de Ambler (A, B et D). Comme les souches qui produisent ces enzymes sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques, elles constituent une menace sanitaire par risque d'impasse thérapeutique. (**Vaux et al., 2011**).

L'émergence des carbapénémases chez les entérobactéries au cours de ces dernières années a conduit les autorités sanitaires de certains pays à mettre en place des programmes visant à maîtriser leur diffusion (**Carmeli et al., 2010**).

Chapitre 6 : Infections causées par les BLSE

1. Définition des syndromes septiques

Les syndromes septiques ne constituent pas une pathologie à part entière mais une somme de symptômes cliniques non spécifiques. En 1991, lors de la conférence de consensus de (Bone et al., 1992) ont fourni les éléments d'une classification des Syndromes septiques.

Quatre stades ont été décrits : le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique par ordre de sévérité. (tableau1).

Le SIRS décrit tout processus Inflammatoire Systémique indépendamment de sa cause ; le sepsis correspond au SIRS associé à un processus infectieux ; le sepsis sévère au sepsis auquel s'ajoute une dysfonction d'organe, une hypo perfusion ou une hypotension ; et enfin le choc septique a un état d'hypotension induit par le sepsis, persistant malgré un remplissage vasculaire adéquat.

De telles définitions ont constitué une première étape dans la volonté de mieux caractériser les patients septiques, le but étant d'une part d'améliorer la pratique clinique courante en améliorant le diagnostic, et d'autre part de standardiser le recrutement de ces patients dans les études cliniques (Bone et al., 1992). Cependant, les définitions proposées se sont avérées insatisfaisantes (trop généralistes, reflétant mal la complexité de la physiopathologie septique) pour être appliquées à une population de patients septiques très hétérogène (Vincent, 1997; Marshall, 2000).

En 2001, lors d'une nouvelle Conférence, les définitions précédemment citées ont été complétées par l'ajout d'autres critères diagnostiques, par analogie avec le « système *Tumor, Nodes, Metastasis* » (TNM) utilisé en cancérologie. Le concept d'un score prenant en compte à la fois les caractéristiques de l'hôte et de l'agent infectieux a été proposé sous le terme de score PIRO (Prédisposition – Infection – Réponse de l'hôte – Dysfonction d'organe) (Levy et al., 2003).

Tableau 1.Définition des syndromes septiques selon la réunion d'experts de l'ACCP/SCCM (Bone et al., 1992).

	Critères de définition
Infection	Invasion par des microorganismes d'un tissu normalement stérile
Réponse systémique inflammatoire (SIRS)	Au moins deux des critères suivants: -température >38°C ou <36°C -fréquence cardiaque >90 bat /min -fréquence respiratoire >20/min ou PaCO ₂ <32mm Hg -leucocytes >12000mm ³ ou<4000mm ³
Sepsis	SIRS associé à une infection
Sepsis sévère	Sepsis associé à: -hypotension (PA systolique <90mmHG ou chute de plus de 40 mm Hg par rapport à la PA systolique habituelle) Ou une hypo perfusion d'organe tel que: Pa O ₂ /FiO ₂ < 280 acidose lactique oligurie < 0.5ml/Kg altération des fonctions supérieures
Choc septique	Sepsis sévère associé à une hypotension persistante (>1heure) malgré un remplissage vasculaire adéquat ou nécessitant administration de médicaments vaso- actifs

FiO₂ : fraction d'oxygène dans l'air expire ; PA : pression artérielle ; PaCO₂ : pression partielle artérielle en CO₂.

2. Epidémiologie des syndromes septiques

2.1. Incidence

Du point de vue épidémiologique, l'incidence du sepsis est en forte augmentation depuis ces deux dernières décennies (**Angus et al., 2001**), ainsi dans une étude récente, la fréquence du sepsis pédiatrique est plus de 42 000 cas par an dans les Etats -Unis aussi (**Wheeler and Bernard, 1999**) ; (**Zerr et al., 2014**). En France, le taux d'incidence du sepsis sévère a été évalué à près de 95 cas pour 100 000 habitants (**Dombrovskiy et al., 2007**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) le sepsis est la quatrième cause de décès chez les enfants, moins de quatre ans (**Bryce et al., 2005**), il est associé à un taux de mortalité à l'hôpital de 30 % à 40 % (**Caille et al., 2004**).

la septicémie bactérienne chez le nouveau-né et le jeune enfant est la huitième cause de mortalité chez les nourrissons américains (**Lukacs and Schrag, 2012**).

2.2.Mortalité et morbidité

La mortalité induite par les syndromes septiques est très élevée, les taux de mortalité varient de 20 % pour la septicémie, (**Martin et al., 2003a**) 40 % pour un sepsis sévère, (Padkin et al., 2003) à 60% pour un choc septique (**Annane et al., 2003**) chez les patients de l'unité de soins intensifs (**Brun-Buisson, 2000**).

Peu d'études ont évalué la mortalité a plus long terme : dans une cohorte de 16 019 patients ayant développé un sepsis sévère aux Etats-Unis, la mortalité a un an s'élevait à 51,4 % et à 5 ans à 74,2 %. Un autre élément pour évaluer l'effet a plus long terme est la morbidité induite par les syndromes septiques, paramètre qui est lui aussi difficile a mesurer, tout d'abord, une étude menée entre 1993 et 2003 a révélé que la sévérité des épisodes septiques a augmenté au cours du temps : la proportion des patients ayant une seule dysfonction d'organe a diminué (72,4 % En 1993 contre 58,2 % en 2003) alors que celle des patients ayant 2,3 et au moins 4 dysfonctions d'organes a été multipliée respectivement par 1,3 ; 1,9 et 2,7 (**Dombrovskiy et al., 2007**) ; après l'épisode séptique, la qualité de vie des patients mesurée a différents niveaux (émotionnel, cognitif, physique, social) semble se dégrader (**Winters et al., 2010**).

Cependant, les outils pour permettre une telle évaluation ne sont pas actuellement bien définis et nécessiteraient d'être standardisés (**Angus et al., 2001**).

Au final, les syndromes septiques sévères ne seraient donc pas seulement des pathologies aiguës, mais pourraient avoir des conséquences à plus long terme (figure 9).

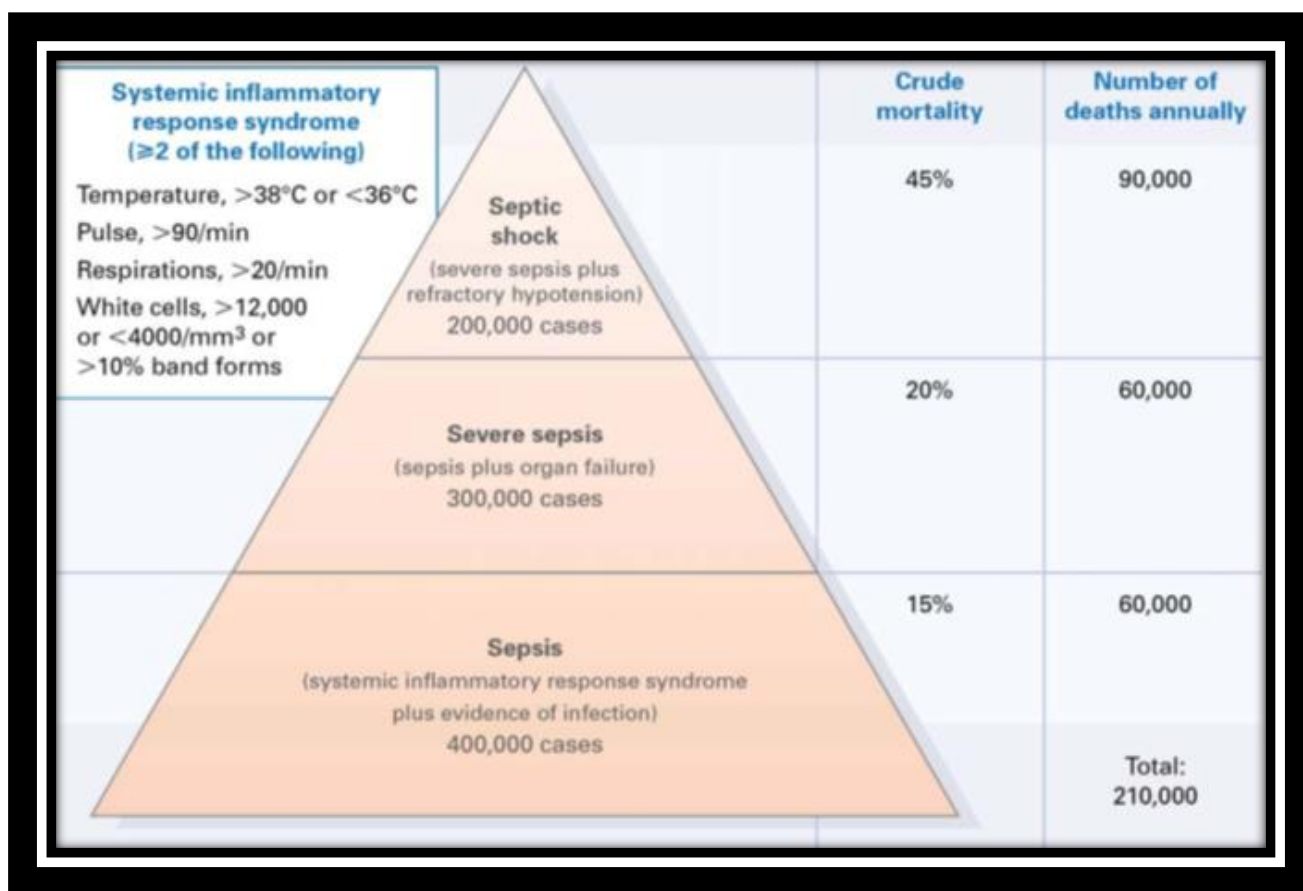


Figure 9. Taux de mortalité des états septiques en fonction du stade de sévérité aux Etats-Unis (Wenzel, 2002).

2.3. Facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque de sepsis ont été rapportés dans la littérature. Ceux-ci dépendent de facteurs liés à l'hôte lui-même et à son degré d'immunodépression. Toute situation favorisant une immunosuppression est un facteur de risque de sepsis. Des facteurs exogènes au patient tels que l'emploi croissant de thérapies immunosuppressives, de chimiothérapies, de procédés invasifs (cathéter intra vasculaire) lors de la prise en charge des patients, l'augmentation des infections causées par des microorganismes résistants aux antibiotiques.

2.3.1. Age

Le principal facteur de risque semble être l'âge. En effet, l'incidence de la septicémie se situe autour d'environ 0.5/1000, mais est nettement plus élevée pour les nouveaux-nés (env.

5/1000) est s'approche de l'incidence observée à l'âge adulte seulement après l'âge de 5 ans (figure.10). La diminution de l'incidence de la septicémie pendant les premières années reflète le renforcement progressif de la compétence immunitaire. En raison de la fonction encore immature des cellules B et T pendant la petite enfance, cette tranche d'âge est particulièrement dépendante de la protection par l'immunité innée. Cette immunité congénitale est formée de cellules (natural killer et cellules dendritiques, granulocytes, macrophages) et de facteurs humoraux qui, après avoir reconnu un pathogène, sont en mesure de déclencher une réponse immune immédiate, en activant aussi le système immunitaire adaptatif (cellules B et T). (Luregn J, et al, 2012).

il semblerait aussi que les personnes âgées sont aussi sujettes à la septicémie et ceci revient à une altération physiologique de leur système immunitaire (Bernard et al., 1997).

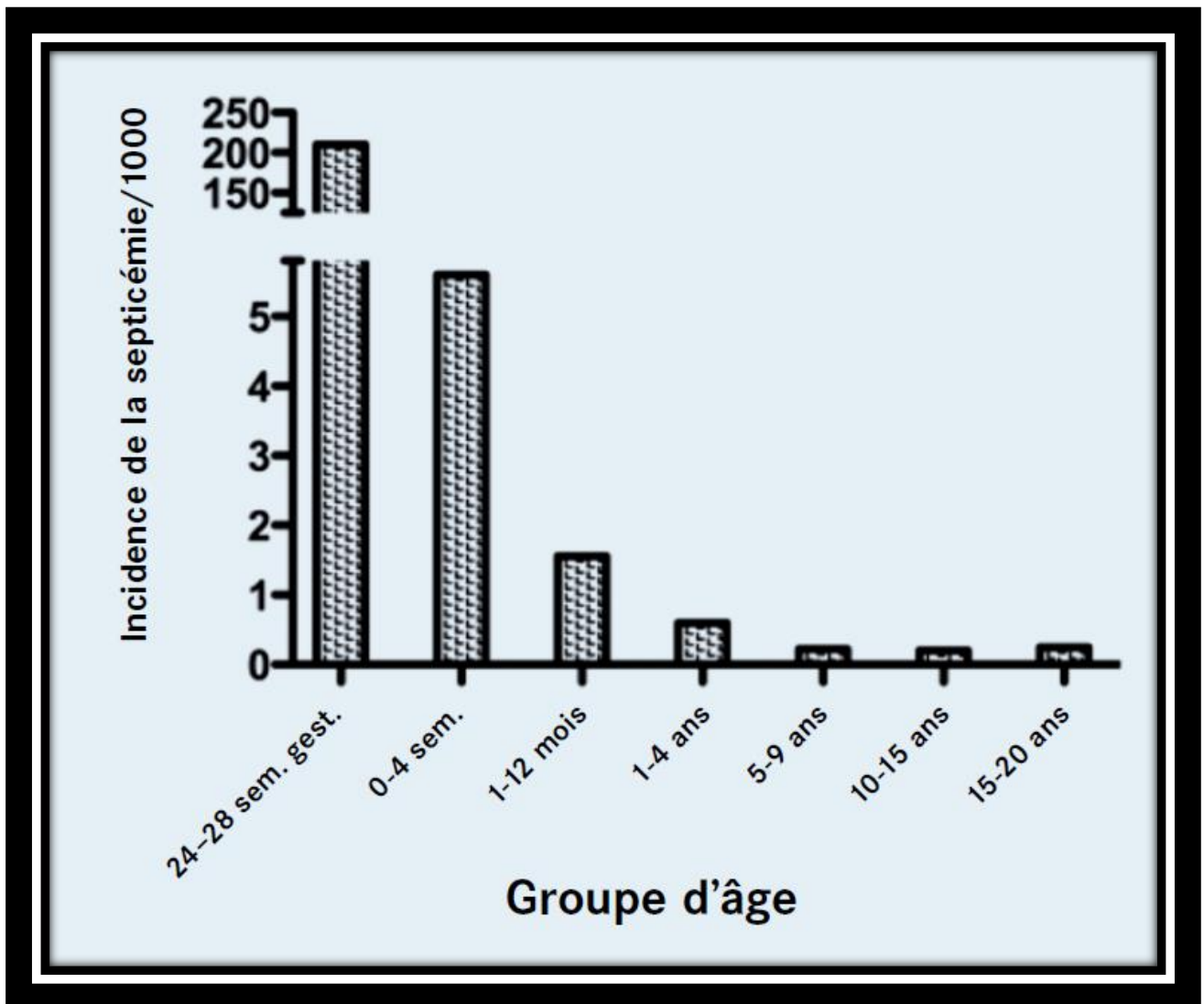


Figure 10. Incidence de la septicémie bactérienne d'après l'âge (Watson et al., 2003).

2.3.2. Sexe

Tout d'abord, il a été observé une proportion d'hommes plus importante que de femmes dans plusieurs cohortes de patients septiques (Figure 11) .

Martin et al., 2003 ont montré que les hommes présentaient un risque de sepsis augmenté de 30 % par rapport aux femmes. **(Berkowitz and Martin, 2007)**.

En fonction des études, cette différence liée au sexe est parfois retrouvée au niveau de la mortalité. Après ajustement sur des facteurs cliniques confondants, Adrie et al., 2007 ont montré que les femmes présentaient un risque de mortalité à l'hôpital réduit par rapport aux hommes.

De même, Angus et al., 2001 ont mesuré un risque de mortalité plus important chez les hommes que chez les femmes 29,3 % contre 27,9 % chez les femmes.

L'explication Physiopathologique de ces différences potentielles liées au sexe n'est actuellement pas clairement connue. Les hormones sexuelles pourraient agir sur les cellules immunitaires ayant des récepteurs pour ces hormones ; des différences ont été mesurées entre hommes et femmes au niveau de la balance pro- ou anti-inflammatoire en réponse à une stimulation avec du lipopolysaccharide (LPS), mais les résultats restent divergents **(Esper et al., 2006 ; Bajčetić et al., 2014)**.

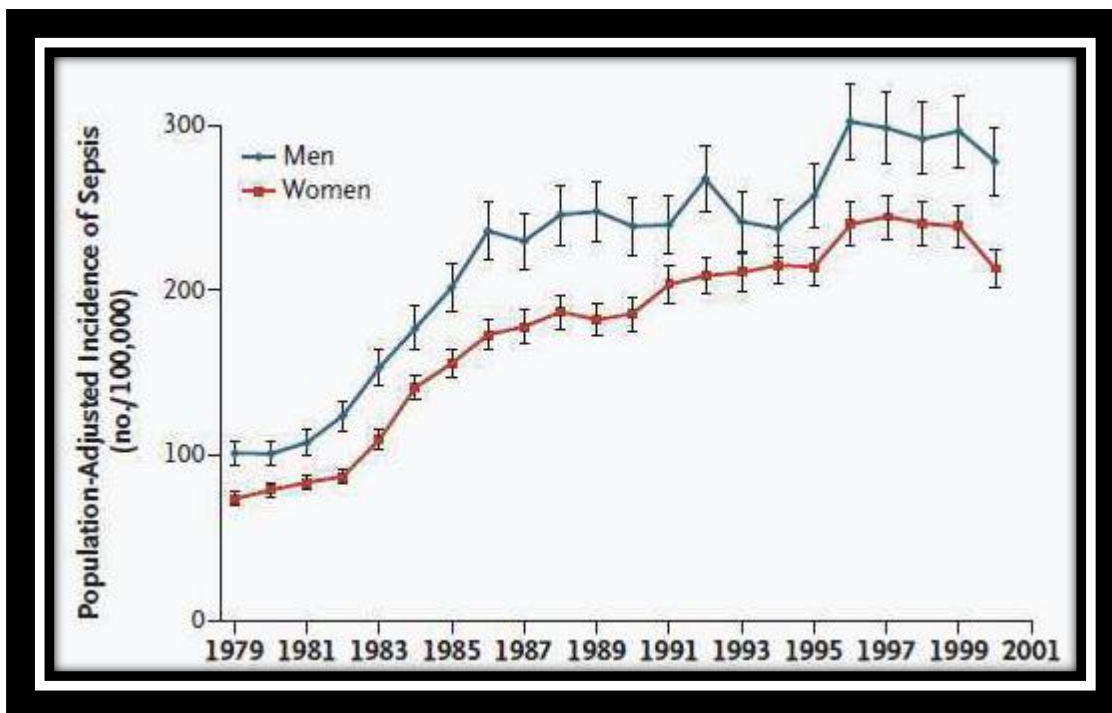


Figure 11. Incidence du sepsis entre 1979 et 2000 aux Etats-Unis en fonction du sexe des patients (Martin et al., 2003).

2.3.3. Etiologie

Les sites d'infection les plus fréquemment répertoriés sont les poumons puis l'abdomen et le tractus urinaire (Vincent et al., 2006; Luzzaro et al., 2011). Depuis les années 1990, il semble que les infections d'origine pulmonaire aient une fréquence en augmentation, les infections urinaires en diminution et les infections d'origine abdominale une fréquence relativement stable (Annane et al., 2003). Cela a été confirmé dans une étude récente chez des patients en réanimation avec 64 % des infections localisées au niveau pulmonaire, 20 % au niveau abdominal, 20 % au niveau de la circulation sanguine et 14 % au niveau du tractus génito-urinaire (Vincent et al., 2009; Osterbur et al., 2014).

Les bactéries les plus fréquemment répertoriées en service de réanimation sont *Escherichia coli* et *Pseudomonas spp* pour les bactéries à Gram négatif, et *Staphylococcus aureus* pour les bactéries à Gram positif (Finfer et al., 2004 ; Vincent et al., 2006 ; Vincent et al., 2009)

Bien qu'il y ait des variations à l'échelle locale, une évolution est observée concernant la prédominance générale des agents pathogènes responsables des états septiques. Alors que dans les années 1980, les bactéries Gram négatif étaient les plus fréquemment responsables des syndromes septiques, les bactéries Gram positif devenaient les plus communes dans les années 1990 (Finfer et al., 2004; Vincent et al., 2006) , étant par exemple responsables de 52,1 % des sepsis aux Etats-Unis en l'an 2000 (Figure 12).

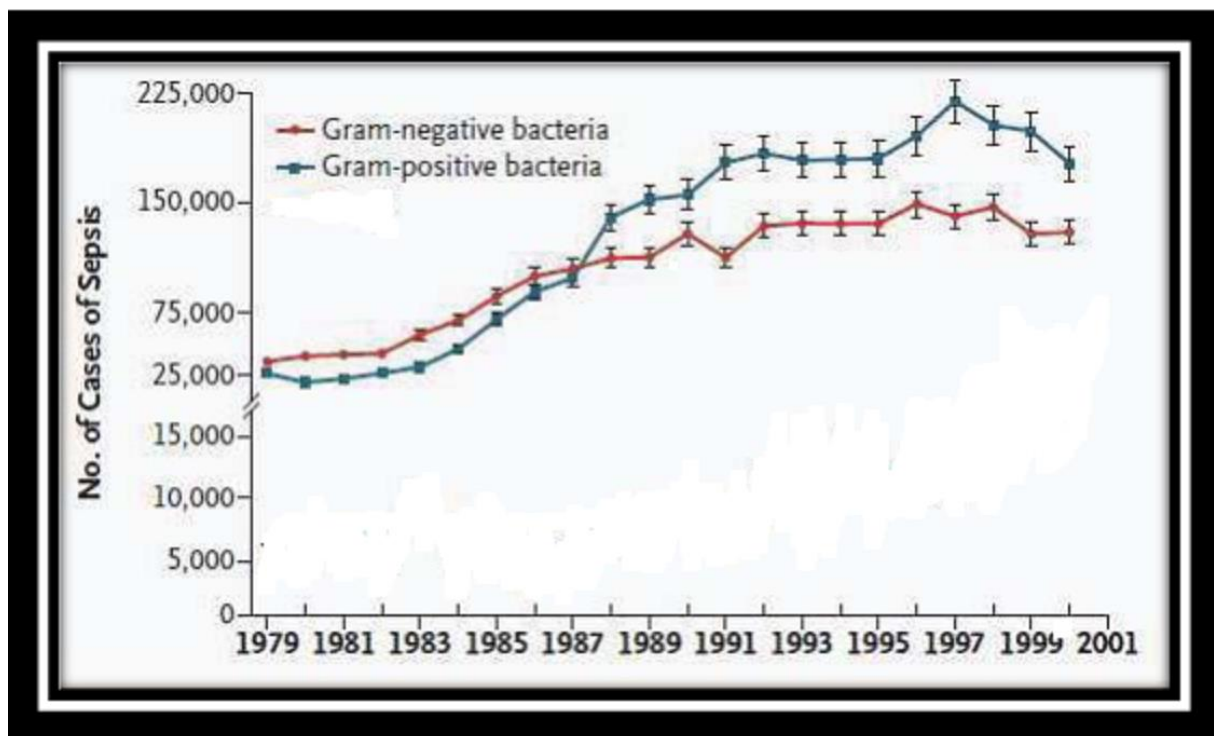


Figure 12. Nombre de cas de sepsis aux Etats-Unis en fonction des microorganismes responsables entre 1979 et 2001 (Finfer et al., 2004).

2.4. Diagnostic des syndromes septiques

Idéalement, le diagnostic du sepsis devrait être réalisé le plus tôt possible après admission du patient pour ne pas retarder sa prise en charge thérapeutique. Cependant le diagnostic du sepsis reste difficile : il repose sur la présence de certains signes cliniques non spécifiques. **(Osterbur et al., 2014).**

Tout d'abord, différentes causes non infectieuses peuvent induire un SIRS telles que des dommages tissulaires (ex : post-traumatisme, post-chirurgie, post-infarctus myocardique), des désordres métaboliques (ex : problème thyroïdien), certaines thérapeutiques (ex : syndrome malin des neuroleptiques) ou des atteintes malignes (ex : syndrome de lyse tumorale, lymphome) **(Liewelyn et al., 2001).**

Concernant le diagnostic d'infection, il peut être cliniquement évident (ex ; purpura fulminants, choc toxique staphylococcique) ou basé sur l'imagerie **(Peleg and Hooper, 2010)**. Dans le cas contraire, il repose essentiellement sur l'isolement du pathogène en cause à partir de prélèvements biologiques ou opératoires. Cependant la localisation du site de l'infection est parfois difficile, et l'interprétation des résultats microbiologiques peut être délicate (ex: distinction entre colonisation et infection). Il est estimé que près de 30 % des cultures bactériologiques sont négatives **(Annane et al., 2005) (Murdoch, 2009)**, ce qui peut s'expliquer notamment par la prise d'antibiotiques antérieure aux prélèvements, ou l'élimination rapide des bactéries hors du compartiment circulant **(Liewelyn et al., 2001)**.

Les données biologiques via l'utilisation de bio-marqueurs, pourraient constituer une alternative intéressante. De nombreuses recherches sont en cours dans ce but. Plusieurs cytokines comme le TNF, l'IL-6 ou l'IL-1 ont été évaluées dans cette indication mais des résultats contradictoires ont été obtenus dans différentes études, et la sensibilité ou la spécificité de ces molécules n'étaient pas satisfaisantes pour le diagnostic infectieux **(Carrigan et al., 2004)**.

Une autre molécule qui a souvent été étudiée pour sa valeur diagnostique des infections est la protéine C réactive (CRP). C'est une protéine de la phase aigüe de l'inflammation qui est produite majoritairement par le foie en réponse à l'IL-6. Sa concentration augmente dans les 4 à 6 heures après l'infection mais s'élève relativement lentement avec un pic entre 36 et 50 heures. **(Póvoa, 2008)**.

Cependant l'augmentation de la CRP n'est pas spécifique d'une infection, par exemple une élévation de la CRP peut perdurer plusieurs jours chez des patients ayant subi une chirurgie.

PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Préambule et objectifs

Après ce bref rappel de littérature sur les types de bactéries responsables des infections septicémiques, il s'agit maintenant d'analyser les caractéristiques des patients inclus dans notre étude; pour cela notre travail a consisté à collecter des prélèvements issus de l'hôpital pédiatrique Sainte-Thérèse et ont été soumis aux diverses analyses au niveau du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Dorban de Annaba.

Les souches sont représentées par des échantillons de sang pour hémoculture d'enfants hospitalisés dont l'âge est compris entre 2 mois et 14 ans et dont les motifs d'hospitalisation étaient plus ou moins graves et dont nous pouvons citer : leucémie, lymphome, détresse respiratoire, bronchite chronique obstructive, anémie, leishmaniose, cystite, pyélonéphrite.

Sur une période allant du 1er Avril 2010 à la fin juillet 2011, 42 prélèvements ont fait l'objet d'une coloration de Gram, d'une identification biochimique par galerie API 20 E biomérieux, et un antibiogramme sur Mueller-Hinton par la méthode de diffusion en milieu solide. L'interprétation des résultats a été faite en adoptant les diamètres de référence établis dans le communiqué de la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de L'OMS (**OMS, 2010**).

La détection des BLSE a été testée par le test de synergie de double disque (DDST).

Les techniques de biologie moléculaire ont été menées en partenariat avec l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes UMR CNRS-6236 (faculté de Médecine et de pharmacie, AIX Marseille- Université).

2. Catégorie des patients (Michel VAUBOURDOLLE, 2007)

La sélection des prélèvements se fait selon l'âge des patients. Pour cette raison les techniques de prélèvements diffèrent d'un patient à un autre. Cela nous a permis de classer les patients en 3 catégories :

-Nouveau- né < 03mois

-Nourrisson : 3 mois-24 mois

-Enfant : 24 mois -14 ans

3. Techniques de prélèvement (Michel VAUBOURDOLLE, 2007)

- Nouveau né et nourrisson : ponction veineuse par une veine épicroténienne, jugulaire ou ombilicale.
- Chez l'enfant, Ponction veineuse, au pli du coude.

La ponction veineuse est la seule méthode valable pour prélever le sang en vue d'une hémoculture; les autres sites de prélèvements, notamment les recueils de sang à travers un dispositif intra vasculaire (cathéters), augmentent de façon significative la fréquence des contaminants

Les prélèvements doivent être répétés afin de majorer les chances d'isolement de l'agent causal.

Classiquement, nous admettons 2 à 3 hémocultures, c'est à dire 4 à 6 flacons (2 à 3 paires Aérobie et anaérobie) sur une période de 24 h. Si on ne peut pas temporiser le traitement, on effectuera avant d'administrer les antibiotiques, 3 hémocultures espacées de 30 mn à 1 h, en choisissant le moment où le patient est en hyper ou hypothermie ($> 38^{\circ}\text{C}$), $< 36^{\circ}\text{C}$ ou en état de frissons.

Chez le jeune enfant, nous avons effectué les prélèvements veineux, car les ponctions capillaires favorisent les contaminations et ne ramènent qu'un échantillon très réduit de sang.

Pour ce qui est du volume de sang à prélever, il doit être de 2 à 5 ml chez l'enfant et de 1 ml chez le nouveau-né et le nourrisson.

Remarque: le prélèvement d'hémoculture chez l'enfant est difficile à maîtriser. Une approche rationnelle consiste à adapter le volume de sang mis en culture en fonction du poids de l'enfant. Le tableau 2 montre le volume indiqué en fonction de l'âge de l'enfant.

Tableau 2. Volume de sang à mettre en culture chez l'enfant (BARRAUK et al, 2004).

Poids de l'enfant (kg)	Volume de sang (ml) par flacon	Nombre de flacons prélevés
≤ 1	0,5-2	1
1,1- 2	1,5-4,5	1
2,1-12,7	3-6	1
12,8-36,3	5	2flacons (aérobie+anaérobie)
≥ 36,3	10	2 flacons (aérobie+anaérobie)

Remarque : Bien respecter les différentes étapes, pour éviter une contamination du prélèvement de sang: porte de la chambre fermée, lavage ou désinfection des mains du préleveur, port de gants stériles, désinfection de l'opercule des flacons d'hémoculture et du point de ponction avec de l'alcool à 70°, ne plus palper la veine après la désinfection du point de ponction (SNYDER JW et al, 2001).

4. Acheminement au laboratoire (BARRAUK et al, 2004).

Les flacons d'hémoculture sont correctement étiquetés avec nom, prénom du malade, service d'hospitalisation, date, heure du prélèvement et température du patient au moment du prélèvement.

Ils sont rapidement acheminés au laboratoire d'analyse, enveloppés dans du coton afin de les maintenir à une température proche de celle de l'organisme.

Ils sont immédiatement placés à l'étuve à 37°C. Une fiche de renseignements cliniques doit impérativement accompagner les flacons vers le laboratoire.

4.1. Suivi des flacons d'hémoculture (SNYDER JW et al, 2001)

Au laboratoire, les flacons sont examinés chaque jour à partir de la 6^{ème} heure d'incubation, à la recherche d'un signe de culture jusqu'au 10^{ème} jour d'incubation.

La surveillance des flacons est visuelle, basée sur la recherche d'un trouble, d'un voile en surface, d'une hémolyse, d'un coagulum, de dépôts blanchâtres floconneux au fond du flacon ou de particules adhérentes sur sa paroi interne.

Les flacons d'hémoculture ne sont jamais ouverts ; l'isolement et l'identification des agents infectieux sont réalisés à partir d'un échantillon prélevé par ponction à la seringue, de chaque flacon.

5. Méthodes d'analyses

5.1. Ensemencement par la méthode de râteau

-Mettre une goutte de sang dans un milieu spécifique aux entérobactéries et ensemer par la méthode d'ensemencement de râteau

Ces milieux sont :

La gélose Mac conkey (qui est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries. En effet, il contient des agents sélectifs qui freinent le développement des bactéries à Gram positif: cristal violet et sels biliars. L'orientation de l'identification est basée sur l'utilisation du lactose, repérable grâce à l'indicateur de pH (rouge neutre).

La Gélose au sang cuit (GSC) qui est un milieu riche car il contient des facteurs de croissance variés par la présence d'un mélange de peptone et qui est constitué de là Gélose Mueller-Hinton additionnée à 10 % de sang frais de cheval dé-fibrine.

-Mettre dans une étuve à 37°C pour les bactéries aéro-anaérobies facultatives.

-Mettre dans une jarre à CO₂ pour les bactéries anaérobies strictes.

5.2. Recherche des entérobactéries

Après l'isolement des germes nous passons à l'identification qui fait appelle à la coloration de Gram et les tests biochimiques.

5.2.1. Coloration de Gram

Cet examen consiste à déposer une goutte de la suspension bactérienne sur une lame puis faire toute une série de coloration en l'occurrence :

1- Après fixation du frottis à la chaleur, couvrir la lame avec le violet de gentiane pendant 90 secondes puis rinçage à l'eau

2- Traiter par la solution de lugol pendant 60 secondes puis rinçage à l'eau.

3- Soumettre le frottis à une étape de décoloration en le traitant avec un solvant comme l'éthanol à 95%. A ce stade, les cellules Gram-négatives seront incolores tandis que, les cellules Gram-positives seront violettes.

4- Couvrir la lame avec la fuchsine pendant 60 secondes puis rinçage à l'eau.

5-Sécher le frottis au papier buvard puis l'examiner à l'objectif à immersion (grossissement x100).

Ce dernier a pour but de noter ; la présence ou l'absence d'une flore bactérienne monomorphe ou polymorphe, l'affinité tinctoriale des éléments bactériens (Gram+ ou Gram-). Par conséquent cet examen nous donne une orientation sur la bactérie.

5.2.2. Identification biochimique

L'identification de ces bactéries est réalisée à partir d'une galerie biochimique API 20E (Biomérieux, Marcy l'étoile, France).

5.2.2.1. Identification par galerie biochimique API 20E

C'est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinés à l'identification des entérobactéries. Ce test regroupe 23 tests biochimiques. Des substrats déshydratés sont contenus dans des micro- tubes. Ces substrats sont mis en solution grâce à une suspension de la bactérie à identifier. A la suite d'une période d'incubation de 24 H à 37°C, permettant à la bactérie de bien réagir avec le substrat, les diverses réactions sont notées afin de déterminer le code d'identification de 7 chiffres appelé « profil numérique » grâce à un logiciel spécial (tableaux 3, 4, 5, 6).(figure13).

Remarque: Le test d'oxydase est effectué avant l'API 20E pour nous permettre d'avoir une totalité des résultats des caractères biochimiques effectués.

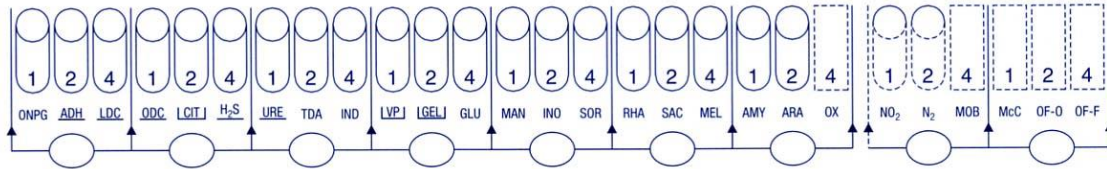
- **Test d'oxydase** (Guillaume, 2004)

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé ainsi que la recherche de la mobilité.

Il est réalisé en ajoutant un disque d'oxydase à une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique qui se traduit par une coloration violette en 2 minutes environ pour une réaction positive.



api® 20 E



	Ident.
--	--------

Figure 13. Photo de la galerie API 20 E avec sa fiche d'identification pour se référer au logiciel.

5.2.3. Identification par spectrométrie de masse (MALDI=Matrix- Assisted Laser Desorption/ Ionisation (Seng et al., 2009)

La spectrométrie de masse est un spectromètre de masse, couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI=Matrix- Assisted Laser Desorption/ Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF=Time Of –Flight mass spectrométrie).

La principale fonction de la spectrométrie de masse MALDI TOF (Microflex, bruker Daltonics, Bermen, Germany), en microbiologie clinique, est l'identification des micro-organismes par l'analyse de leurs protéines totales. La spectrométrie de masse combinée à une désorption-ionisation laser assistée par une matrice, d'une bactérie isolée, permet de réaliser cette identification en quelques minutes et avec une haute précision (**Seng et al., 2009**).

Le protocole appliqué pour identifier les souches bactériennes, collectées est le suivant :

Nettoyage de la plaque-cible (plaque métallique) :

- Rincer la cible avec de l'eau chaude en frottant avec du papier de précision pour ne pas la rayer.
- Rincer avec de l'éthanol à 70% en frottant avec du papier de précision.
- Répéter les deux premières étapes.
- Placer la cible dans un petit réservoir en inox et la recouvrir d'éthanol à 70%.
- Laisser agir pendant 15 minutes puis éliminer l'éthanol.
- Déposer sur la cible 500µl de TFA 80%, frotter avec du papier de précision.
- Rincer la cible avec de l'eau HPLC et laisser sécher 15minutes à l'air libre.

- Préparation de la matrice :

La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoqué par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident

Dans cette étude, nous avons utilisé, sous une hotte chimique, un protocole de préparation de la matrice ;

- Mettre dans un tube à Eppendorf, 2g de HCCA
- Ajouter 500 µl d'acétonitrile
- Ajouter 250 µl de TFA à 10%
- Ajouter 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer pendant 10 minutes dans un Bain a ultrasons
- Centrifuger 5minutes à 13000 rpm

-Transférer le surnageant dans un tube à Eppendorf propre

Ainsi la matrice est prête à être utilisée.

- **Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométrique**

Sous un PSM, prélever les bactéries à identifier, à partir d'une culture bactérienne de 24 heures, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5mm², sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris du laser. Pour chaque souche, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreurs.

- Déposer 2 µl de matrice sur chaque spot.

- Laisser sécher sous la hotte pendant 15minutes pour remettre sa co- cristallisation avec l'échantillon bactérien

- **Insertion de la cible et lancement du MALDI TOF**

- La cible est ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex) et exposée sous -vide, aux tris du laser.

Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.

Lancer le spectromètre de masse : Microflex.

- **Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique :**

Le MALDI -TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel MALDI Biotyper 2.0. La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue, ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce.

Le résultat d'identification est donné par le logiciel MALDI Biotyper. L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par le MALDI TOF est ≥ 1.9 .

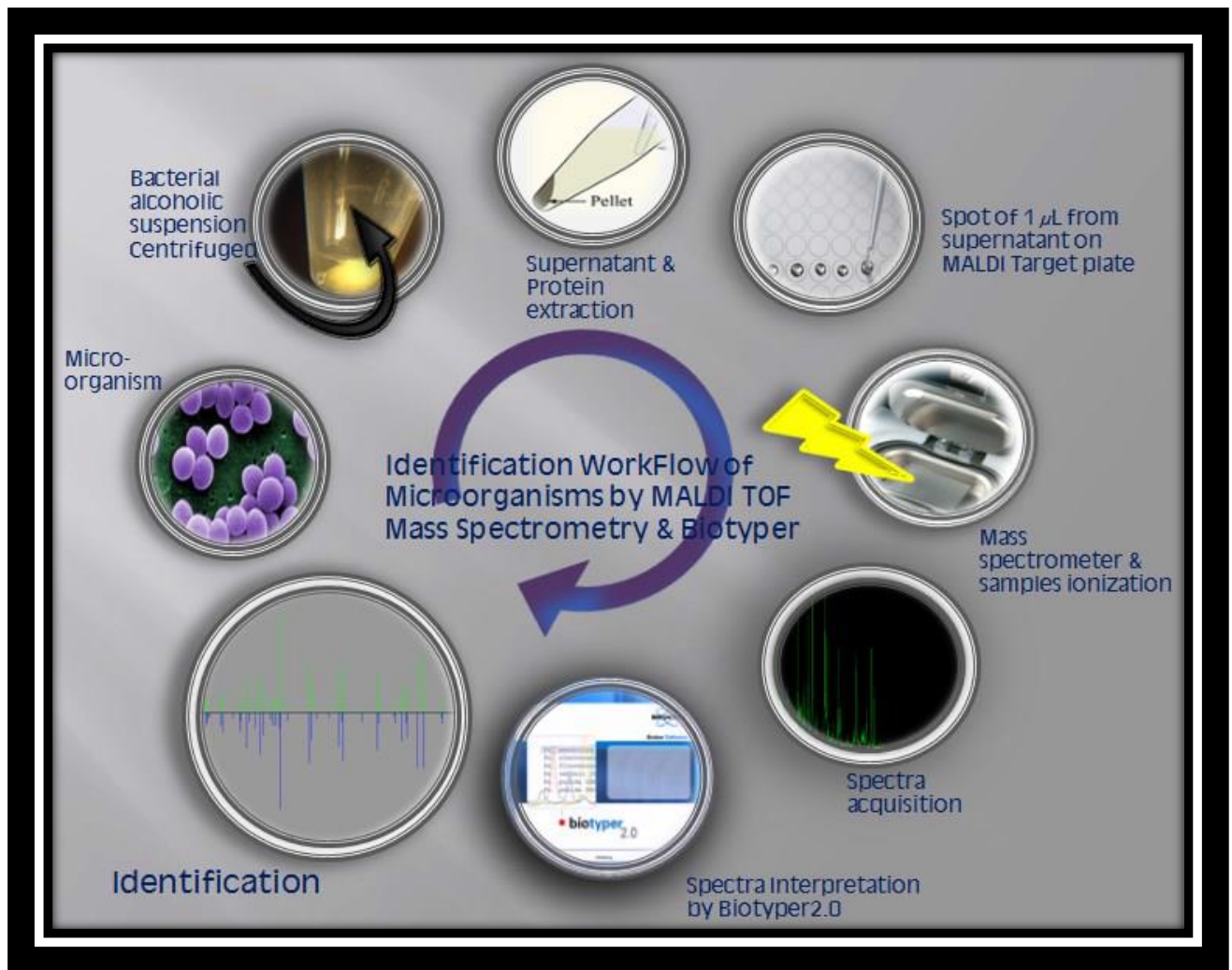


Figure 14. Schéma général de l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS.

5.3. Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu solide

La sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu solide sur le milieu de Mueller-Hinton (MH) selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010).

Milieu : Gélose Mueller-Hinton (MH), coulée en boîtes de petri sur une épaisseur de 4 mm.

- Les géloses sont séchées avant l'emploi. Aucune goutte d'eau ne doit être apparente à la surface de la gélose.

5.3.1. Préparation de l'inoculum

La méthode nécessite l'obtention d'un inoculum dont la turbidité est identique à l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland. Une densité optique égale de (0,2 à 650 nm).

-Mettre en suspension une à plusieurs colonies dans une solution contenant 5ml d'eau physiologique stérile à 0.95% de façon à obtenir un trouble identique à celui de l'étalon 0,5 de la gamme McFarland.

-L'inoculum doit être employé de façon optimale dans un délai de 15 minutes sans jamais dépasser une heure.

-Plonger l'écouvillon en coton dans la suspension bactérienne et jeter l'excès en tournant l'écouvillon à l'intérieur du tube.

-Etaler sur toute la surface en ensemençant dans trois directions soit à l'aide d'un système rotatif ou en tournant la boîte à chaque fois à 60° sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur- lui-même.

-Répéter l'opération deux fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Vérifier que les diamètres d'inhibition des souches de contrôle de qualité sont dans les limites requises, un inoculum lourd engendre des diamètres plus petits.

Il ne faut pas mettre plus de 8 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre.

Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince pour s'assurer de son application.

-Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.

- Le dépôt des disques doit être réalisé dans les 15 minutes qui suivent l'inoculation.

-Les disques doivent être en contact ferme avec la surface de la gélose.

-La disposition des disques devra être telle que les zones d'inhibition des souches sensibles ne se superposent pas; ce qui entraîne une gêne dans la mesure des diamètres.

(On peut appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'un applicateur automatique)

-Incubation : Pendant 24 heures à 37°C.

5.3.2. Lecture des boîtes après incubation

-Un inoculum correct et un ensemencement en stries satisfaisant conduisent à une culture confluyente.

-L'obtention de colonies isolées traduit une légèreté de l'inoculum et nécessite une reprise du test.

-Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée puis comparer ces résultats aux valeurs critiques (tableau 3).

Les disques d'antibiotiques (biomérieux, Marcy l'étoile, France), suivants ont été testés : piperacilline (75µg), ticarcilline (75µg), amoxicilline/ acide clavulanic (20/10µg), piperacilline/tazobactam (75/10µg), cefazoline (30µg), cefoxitine (30µg), cefuroxime (30µg), cefotaxime (30µg), ceftazidime (30µg), ceftriaxone (30µg), céfépime (30µg), Aztreoname (30µg), imipenème (10µg), amikacine (30µg), gentamicine (15µg) acide nalidixique (30µg), ofloxacine (5µg), pefloxacine (5µg), ciprofloxacine (5µg), tetracycline (30µg), colistine (50µg), nitrofurantoine (300µg), trimethoprim / sulfamethoxazole (1,25 / 23,75µg) and fosfomycine (50µg).

La souche de référence *E.coli* ATTC 25922 (souche sensible à tous les antibiotiques) a été utilisée comme souches de contrôle (délivrée de l'institut Pasteur d'Alger).

Tableau 3.Diamètre critique des différents antibiotiques utilisés (CA-SFM 2010).

Diamètre critique (mm)		
Antibiotique	Sensible	Résistant
Ticarcilline	≥ 24	< 22
Piperacilline	≥ 20	< 16
Amoxicilline / acide clavulanique	≥ 21	< 16
Cefazoline	≥ 18	< 14
Cefuroxime	≥ 22	< 22
Cefotaxime	≥ 26	< 23
Ceftazidime	≥ 26	< 21
Ceftriaxone	≥ 26	< 23
Cefepime	≥ 24	< 21
Aztreoname	≥ 27	< 21
Cefoxitine	≥ 18	< 14
Piperacilline/tazobactame	≥ 21	< 17
Imipineme	≥ 24	< 17
Gentmicine	≥ 18	< 16
Amikacine	≥ 17	< 15
Acide- Nalidixique	≥ 20	< 15
Pefloxacine	≥ 22	< 16
Ofloxacine	≥ 25	< 22
Ciprofloxacine	≥ 25	< 22
Tetracycline	≥ 19	< 17
Colistine	≥ 15	< 15
Nitrofurantoin	≥ 15	< 15
Trimethoprime/sulfamethoxazoe	≥ 16	< 10
Fosfomycine	≥ 14	< 14

5.4. Détermination de la CMI en milieu solide (CASFM, 2010)

5.4.1. Principe

La méthode de dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

5.4.2. Technique

- Préparation des solutions d'antibiotiques

Pour chacun d'antibiotique, préparer une solution mère à 5120 mg/l puis réaliser des dilutions séries de progression géométrique de raison $\frac{1}{2}$

- Préparation des boîtes

- Distribuer 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans une série de boîte de Petri ainsi que 2 ml d'eau distillée stérile dans une boîte de Petri témoin
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller Hinton glosé maintenu en surfusion
- Bien mélanger et laisser solidifier
- Sécher les boîtes 30 mn à l'étuve à 37°C.

- Préparation de l'inoculum

Préparer des suspensions de 10^8 UFC/ml pour chacune des souches à tester.

- Ensemencement

- Diluer la suspension d'inoculum au 1/10
- Ensemencer par spot 1 à 2 μ l de la suspension bactérienne, soit un inoculum de 10^4 UFC/spot.
- **Incubation:** Incuber 18 à 24 H à 37°C.

- Lecture

S'assurer de la croissance des souches au niveau de la boîte témoin ; la concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration où il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération.

5.5. La détection phénotypique des BLSE

5.5.1. Test de Synergie

Les isolats présentant un diamètre d'inhibition ≤ 18 mm avec la céfoxitine ou 22 mm avec la ceftazidime, ont été identifiés comme potentiels producteurs de BLSE, selon les recommandations du comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Le dépistage des souches sécrétant des BLSE chez les souches d'Entérobactéries a été réalisé par le test de synergie disque double (DDST) décrit par (Jarlier et al., 1988) à l'aide d'un disque central d'amoxicilline + acide clavulanique, séparé de 20 mm de cefotaxime, ceftazidime, l'aztréoname. La présence de BLSE a été notée par la présence de l'aspect de bouchon de champagne (Figure 15).



Figure 15. Test de synergie positif (aspect en bouchon de champagne).

5.5.2. Test à la cloxacilline (De Champs et al., 2002) , (Naas, 2003)

5.5.2.1.Principe

Pour certaines souches de bacille à Gram négatif, il est parfois difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel les hyperproductions de céphalosporinases des β -lactamases à spectre élargi (BLSE). En cas d'hyperproduction, les diamètres autour des disques de C3G très diminués peuvent masquer les images de synergies évocatrices de BLSE entre des disques de C3G et d'acide clavulanique. La cloxacilline (Orbénine®), ajoutée au milieu pour

l'antibiogramme (Mueller-Hinton), inhibe *in vitro* les céphalosporinases de la classe C d'Amber chromosomiques ou plasmidiques et reste inefficace sur les pénicillinases des bacilles à Gram négatif

5.5.2.2. Technique

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton contenant de la cloxacilline à une concentration finale de 250 µg/ml; dans ce cas il faut dissoudre 0,25 g de Cloxacilline dans 25 ml d'eau distillée pour préparer une concentration de 10000 µg/ml puis procéder à une dilution à 2500 µg/ml; Pour une boîte ronde (90 mm), mettre 2 ml de cette concentration et 18 ml de Mueller-Hinton.

5.5.2.3. Lecture

L'interprétation des résultats peut se traduire, en comparant les boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller -Hinton simple et celles contenant les géloses supplémentées de la cloxacilline. Un résultat positif est noté lorsque une augmentation des diamètres d'inhibition, d'au moins 8 mm autour des disques de céfotaxime CTX et céftazidime CAZ, est observé (Figure 16).



Figure 16. Méthode à la cloxacilline (image de synergie positive).

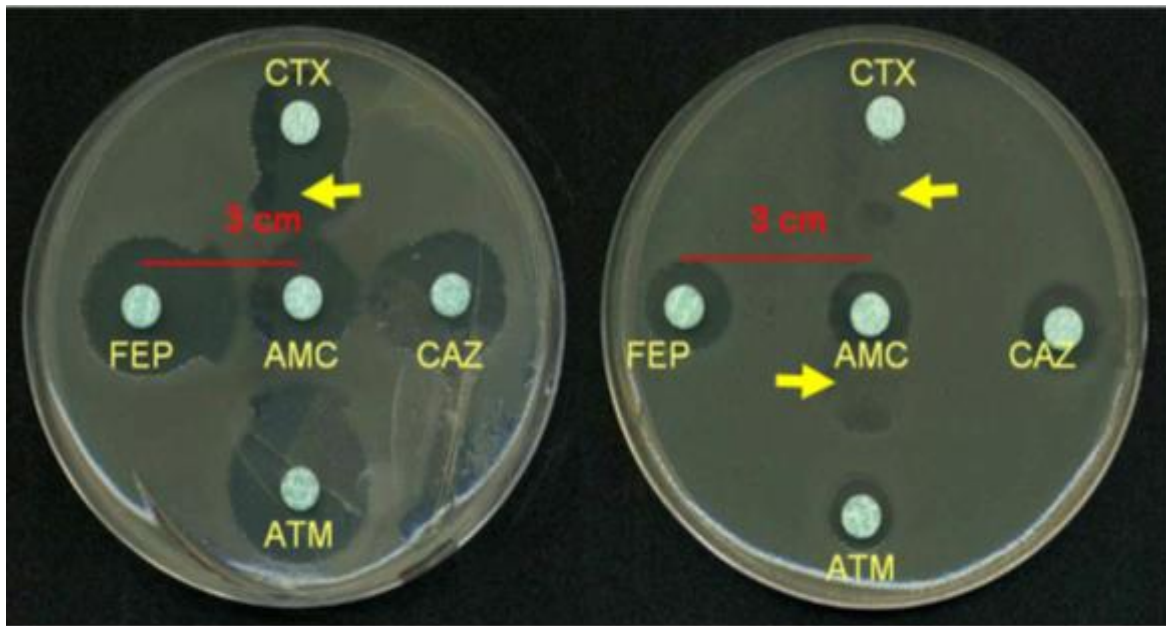


Figure 17. Photo montrant une image de synergie.

5.5.3. Test du double disque (test espagnol)

La détection de la bêta-lactamase à spectre élargi (ou étendu) peut être confirmée par le test du double disque. Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'association amoxicilline – acide clavulanique (AMC), comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose Mueller-Hinton (**Rahal et al, 2010**). Une suspension bactérienne d'une opacité égale à 0,5 MC Farland a été préparée partir d'une culture de 18 h, une gélose Mueller-Hinton est ensuite ensemencée selon la technique de l'antibiogramme. Deux disques l'un contenant l'AMC, l'autre une céphalosporine de troisième génération (CTX). La diffusion était faite à la température ambiante du laboratoire pendant une heure, puis le disque l'AMC est remplacé par un disque contenant la même céphalosporine de troisième génération, les boîtes de Petri sont incubées 18 heures à 35 °C.

5.6. Recherche moléculaire des BLSE

Au cours de notre travail, nous avons recherché l'identification des bêta-lactamases de classe A pour cela nous avons recherché les gènes ; *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* par PCR standard.

5.6.1. Polymérase Chaîne Réaction (PCR standard)

Le principe de la Polymérase Chain Réaction (PCR) consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible. Les réactions d'amplification des gènes codant pour les β -lactamases sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques dans un Thermocycleur de type Bio Rad. nous avons désigné les amorces suivant les gènes étudiés grâce au logiciel primer 3 (**Tableau 4**). Après obtention des amplicons, ces derniers sont ensuite purifiés et séquencés. Les séquences sont comparées à celles déposées dans une banque de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

5.6.1.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du kit Qiagen : mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les conditions spécifiées par les fournisseurs :

- Pipeter 20 μ l de protéase QIAGEN (ou la protéinase K) est le mettre dans un tube à Eppendorf de 1.5 ml.
- Ajouter 200 μ l d'échantillon (suspension bactérienne) dans le tube Eppendorf de 1.5ml.
- Ajouter 200ul de Buffer AL (tampon) à l'échantillon. Mixer (vortex) pendant 15s afin d'assurer une lyse efficace. Il est essentiel que l'échantillon et le Buffer AL soient bien mélangés pour obtenir une solution homogène.
- Incuber ce mélange pendant 30 min à 70°C.
- Centrifuger 1min à 13000 rpm le tube Eppendorf de 1.5ml pour récupérer les gouttelettes à l'intérieur du couvercle.
- Ajouter 200 μ l d'éthanol (96-100%) à l'échantillon et mélanger à nouveau en vortexant pendant 15s. le mélange dans l'Eppendorf est centrifugé pendant 1min à 1300 rpm.
- Transvaser soigneusement le mélange du tube Eppendorf dans la colonne QIA amp Mini [la colonne contient un tube avec filtre qui est placé dans un tube collecteur (fourni) de 2 ml] sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 13000 rpm pendant 1min.
Jeter le contenant du tube collecteur.
- Ouvrir la colonne QIA amp Mini et ajouter 500 μ l de Buffer (tampon) AW1 sans mouiller le bord.
Fermer le capuchon et centrifuger à 1300 rpm pendant 1min.
- Après la centrifugation jeter le contenu dans un tube collecteur (fourni) contenant le filtrat.
- Ajouter 500 μ l du Buffer (tampon) AW2 dans la colonne QIA amp Mini, fermer le capuchon et centrifuger à vitesse maximale (20000 x g ; 14000 rpm) pendant 3 min.

Placer la colonne QIA amp Mini filtre dans un nouveau tube Eppendorf de 2ml (non fourni) et jeter l'ancien tube collecteur (fourni) contenant l'effluent.

Centrifuger et accélérer pendant 1 min.

Cette étape permet d'éliminer le risque de tampon AW2 report possible.

Placer la colonne QIA amp Mini spin dans un nouveau tube Eppendorf de 1.5ml (non fourni) et jeter le tube contenant le filtrat .Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp Mini rotation et ajouter 200 µl de tampon AE ou d'eau distillée. Incuber à température ambiante (15-25°C) pendant 1min, puis centrifuger à 13000 rpm pendant 1min et récupérer le contenu de l'Eppendorf qui est de l'ADN extrait. Puis jeter la colonne QIA amp Mini Spin. L'incubation de la colonne QIA amp Mini chargée de tampon AE ou d'eau pendant 5min à température ambiante avant centrifugation augmente généralement le rendement d'ADN.

5.6.1.2. Protocole d'une PCR standard

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR standard est le suivant :

Dans une plaque pour thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cycler) Bio Rad on dépose 25µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 4) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le themocycleur

Le dépistage des gènes *bla*_{TEM-1},*bla*_{TEM 136}, *bla*_{SHV 11} *bla*_{SHV 12}, *bla*_{SHV 28},*bla*_{SHV 32},et *bla*_{CTX-M15} à été réalisée sur les souches *K.pneumoniae*, *E. cloacae*, *E.coli* et *S. marcescens* en utilisant des amorces spécifiques (tableau5), et pour chaque réaction de PCR , nous avons utilisé un ADN d'une souche produisant le gène à tester comme témoin positif.

Tableau 4.Composition des mélanges réactionnels pour la PCR standard.

Quantitect Probe PCR Master Mix	125µl
Amorce Forward	0,5µl
Amorce Reverse	0,5µl
H2O UP	6,5µl
ADN à amplifier	5µl
Volume total	25µl

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un themocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems). Une réaction de PCR classique comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN

d'intérêt avec 60 secondes à 94°C (dénaturation) 50 secondes à 50-60°C (Appariement des amorces, température variable selon le T_m des amorces) et une min 30 secondes à 72°C (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 7 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés

Tableau 5. Amorces utilisées pour PCR standard.

Cible	Nom de la séquence	Séquence cible	Amplicon taille (bp)	Référence
CTX-M	CTX Szabo R	TGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	334	(Edelstein et al., 2003)
	CTX Szabo F	TCACKCGGRTCGCCNGGRAT		
TEM	TEM Szabo R	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	862	(Kruger et al, 2004)
	TEM Szabo F	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
SHV	SHV Szabo R	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	998	(Yagi et al., 2000)
	SHV Szabo F	TTTATGGCGTTACCTTTGACC		

5.6.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (Tris, Brate, EDTA) à 0,5%. La migration se fait pendant 30 minutes sous un voltage de 135 V

5.6.2.1. Protocole de préparation du gel d'agarose

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400 ml du tampon TBE (Tris, Brate, EDTA) 0.5X.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.
- Ajouter le BET (3fois 31,5µl pour 50 ml) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.
- Laisser refroidir jusqu'à solidification de gel à température ambiante.

5.6.2.2. Electrophorèse des produits d'amplification

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 0.5X (le gel doit être totalement émergé).
- Déposer 4µl de DNA marqueur de poids moléculaire [(100base-Paire-Ladder (gibco-BRL, 15628-019)] dans le premier puits.
- Mélanger 4µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte de Bleu de Juice.
- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif et un témoin positif.
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur.
- Mettre l'alimentation sous tension à 135 V et régler la durée de migration (environ 30 min).
- Une fois la migration finie, placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

5.6.2.3. Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. La présence de la bande correspond au fragment amplifié a été comparé avec le marqueur de poids moléculaire et celui du témoin positif.

5.6.3. Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée (Sanger et al., 1992), en utilisant le kit big dye terminator v3.1 Matrix Standard kit (Applied Biosystems, Foster, city, CA,USA) et le séquenceur ABI 3730 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur.

5.6.3.1.Purification

-Après électrophorèse, vérifier sur le système à d'imagerie à UV, la présence des bandes ADN

-Ajouter au produit PCR 100 µl d'eau ultra pure, puis on transfère le tout dans une plaque à filtre pour la première purification. Ensuite, déposer cette plaque à filtre sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Enfin ajouter 50 µl d'eau ultra pure et agiter pendant 20 min à l'aide d'un agitateur.

Le produit est prêt pour la PCR Big Dye.

5.6.3.2.PCR Big Dye

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR Big Dye est le suivant :

Dans une plaque de thermocycleur Bio Rad on dépose 20µl du mélange réactionnel dans chaque puits (décrit dans le tableau 6).

Tableau 6.Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big-dye.

Composants pour Amorce Forward	Composants pour Amorce Reverse	Quantité PCR Big Dye
Buffer	Buffer	3 µl
Mix Big Dye	Mix Big Dye	2 µl
Amorce F	Amorce R	1 µl
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4 µl
H ₂ O UP	H ₂ O UP	10 µl
Volume total	Volume total	20 µl

Pour chaque amorce, on fait 2 mélanges réactionnels séparés, un pour le Forward et l'autre pour le Reverse, exécuté selon le programme porté dans le tableau 7.

Tableau 7. Programme de l'amplification de la PCR Big Dye.

Température	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Temps	2min	10 sec	5 sec	1min 5sec	∞

5.6.3.3. Purification par gel séphadex

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par séphadex (G50 de la marque sigma) ;

- Mettre la poudre de Séphadex dans les puits de la plaque à filtre auxquels il faut ajouter 300 µl d'eau UP et laisser reposer 2 à 3 heures.

Mettre une plaque en dessus de la plaque à filtre pour récupérer l'eau après centrifugation (l'eau sera jetée par la suite).

-Centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min à 10°C.

-Mettre par la suite, les produits PCR Big Dye dans la plaque à filtre plus une deuxième plaque en dessous (plaque pour le séquençage) pour récupérer le produit à centrifuger.

-Centrifugation à 1200 rpm pendant 10 min à 10°C.

-Récupérer les produits PCR purifiés et centrifugés destinés au séquençage.

5.6.3.4. Méthode du séquençage

Remplir les fiches pour le séquençage sur le logiciel.

Mettre la plaque pour le séquençage sur le support et la déposer dans le séquenceur Automate ABI3730.

-Lancer le séquençage.

5.6.3.4.1. Analyse des séquences

Les séquences brutes obtenues par le séquençage ont été analysées et corrigées par le logiciel Codon Code Aligner.

Les séquences analysées et corrigées sont comparées *via* internet à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée « GenBank » en utilisant deux méthodes soit le BLASTN qui utilise les séquences nucléotidiques et qui compare les bases azotées de l'ADN ou le BLASTP qui utilise les séquences protéiques et qui compare les acides aminés de la protéine traduite. Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la

souche à identifier avec les espèces les plus proches (figure 18) (Altschul et al., 1997).
Ensuite déterminer leur affiliation phylogénétique.

9ctxm



[emb|FR828676.1](#) Escherichia coli plasmid pCTX913 tnpA gene, blaCTX-M-15 gene
and delta tnpA gene (partial), isolate 913

Length=2656

Score = 575 bits (311), Expect = 6e-161

Identities = 311/311 (100%), Gaps = 0/311 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
Query 5  GCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTT 64
|||||
Sbjct 1159 GCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTT 1218

Query 65  GAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGG 124
|||||
Sbjct 1219 GAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGG 1278

Query 125  ACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATG 184
|||||
Sbjct 1279 ACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATG 1338

Query 185  AATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTG 244
|||||
Sbjct 1339 AATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTG 1398

Query 245  GGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGC 304
|||||
Sbjct 1399 GGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGC 1458

Query 305  GATCCGCGTGA 315
|||||
Sbjct 1459 GATCCGCGTGA 1469
```

Figure 18. Exemple d'un gène CTX-M corrigé et comparé à une séquence homologue de «
Gene bank » qui présente une similitude à 100%.

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Notre étude a été portée sur des malades reçus au niveau du service de réanimation de la clinique pédiatrique Sainte Thérèse d'Annaba couvrant les wilayas (Annaba, Guelma, Tarf, Skikda, Souk Ahras, et Tébessa).

Durant notre travail de Mars 2010 à juillet 2011, un total de 500 hospitalisations ont été enregistrées au niveau de ce service. Au cours de cette période, 42 épisodes septicémiques ont été diagnostiqués sur une population d'âge, comprise entre 2 mois et 14 ans ou la tranche d'âge la plus exposée est de 48 mois, on peut donc dire que ce sont essentiellement des enfants qui sont concernés

1. Identification et origine des souches

Les 42 souches de ont été isolées a partir d'un seul type de prélèvement en l'occurrence l'hémoculture et l'identification des ces dernières à été faite par API 20E système (Biomerieux, Marcy l'étoile, France) et confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) (Seng et al., 2009) dont on a noté de très bons scores de 2,19 et 2,34.

Tableau 8. Traduction des profils numériques de *Klebsiella pneumoniae* en caractères biochimiques.

	5215773	5205773	5215573	5205573
ONPG	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-
CIT	+	+	+	-
H2S	-	-	-	-
UREE	+	-	+	-
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-
VP	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+
INO	+	+	-	-
SOR	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+

Tableau 9. Traduction des profils numériques d'*Enterobacter cloacae* en caractères biochimiques.

	3304773	3305773	3205573	3304573	3305573
ONPG	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-
ODC	+	+	-	+	+
CIT	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-
UREE	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	-	+
GEL	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	+	+	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+

Tableau 10. Traduction des profils numériques de *Serratia marcescens* en caractères biochimiques.

	5307761	5307721	5307761	5307721
ONPG	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+
H₂S	-	-	-	-
UREE	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-
VP	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+
INO	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+
RHA	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+
MEL	+	-	-	-
AMY	+	+	+	+
ARA	-	-	-	-

Tableau 11. Traduction des profils numériques d'*Escherichia coli* en caractères biochimiques

	5144552	5344552	5344552
ONPG	+	+	+
ADH	-	-	-
LDC	+	+	+
ODC	+	+	+
CIT	-	+	+
H2S	-	-	-
UREE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	+	+	+
VP	-	-	-
GEL	-	-	-
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	-	-
SOR	+	+	+
RHA	+	+	+
SAC	-	-	-
MEL	+	+	+
AMY	-	-	-
ARA	+	+	+

1.1. Répartition des souches selon l'âge

1.1.1. Cas de *Klebsiella pneumoniae*, d'*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*

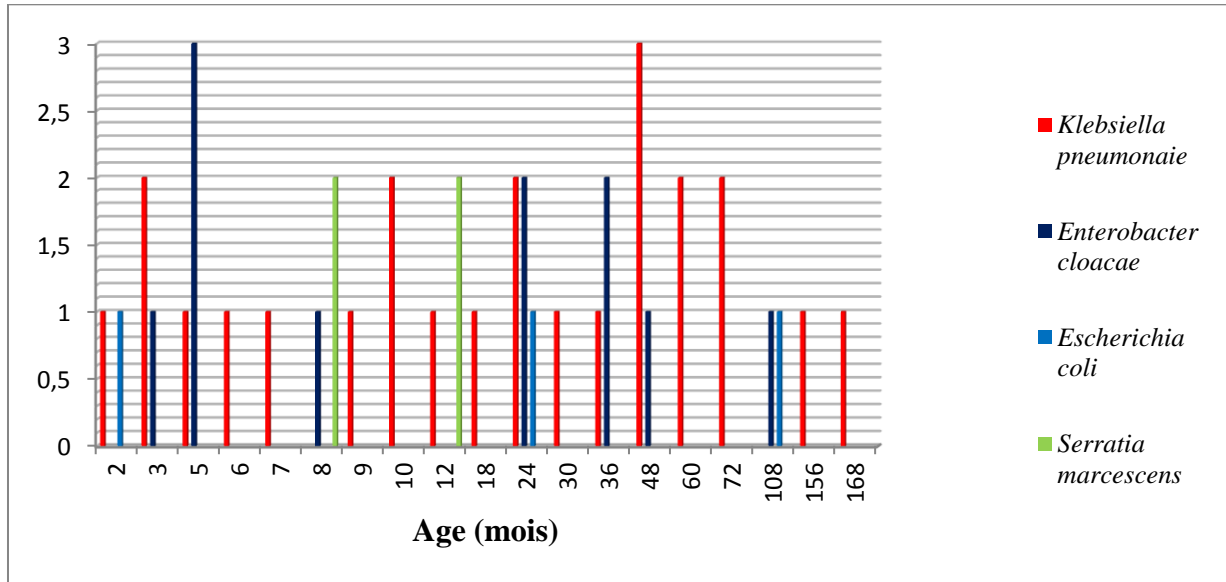


Figure 19. Répartition des souches selon l'âge chez *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*.

1.2. Répartition des souches selon le sexe

1.2.1. Cas de *Klebsiella pneumoniae*

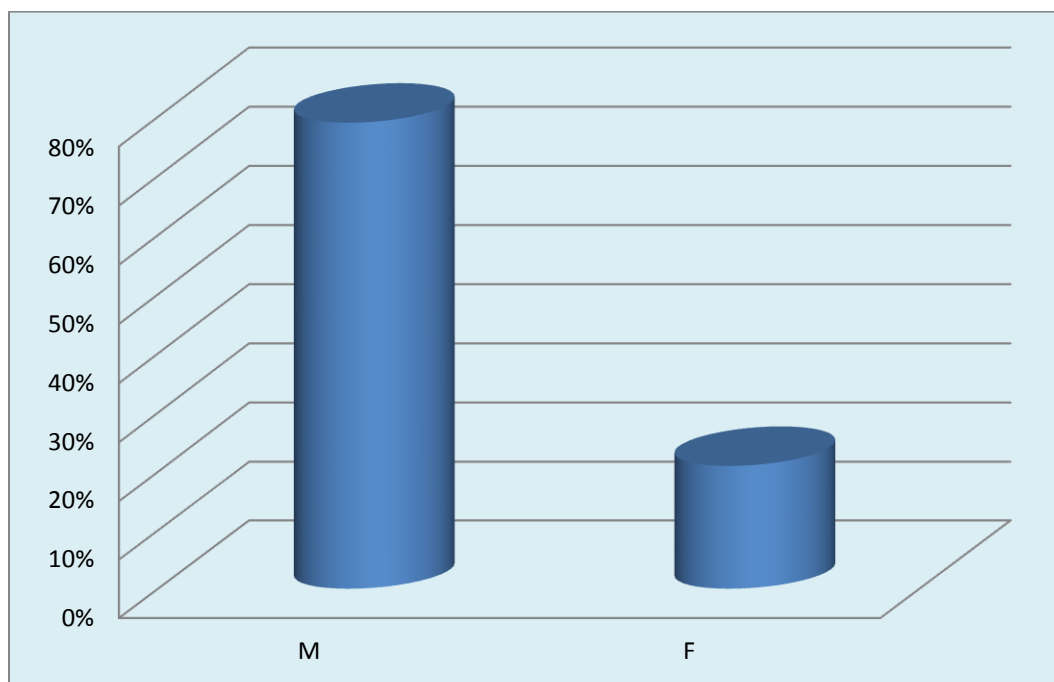


Figure 20. Répartition des souches selon le sexe chez *Klebsiella pneumoniae*.

La figure montre que le sexe prédominant est le sexe masculin avec un pourcentage de 79% cependant le sexe féminin est de 21%.

1.2.2. Cas d'*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*

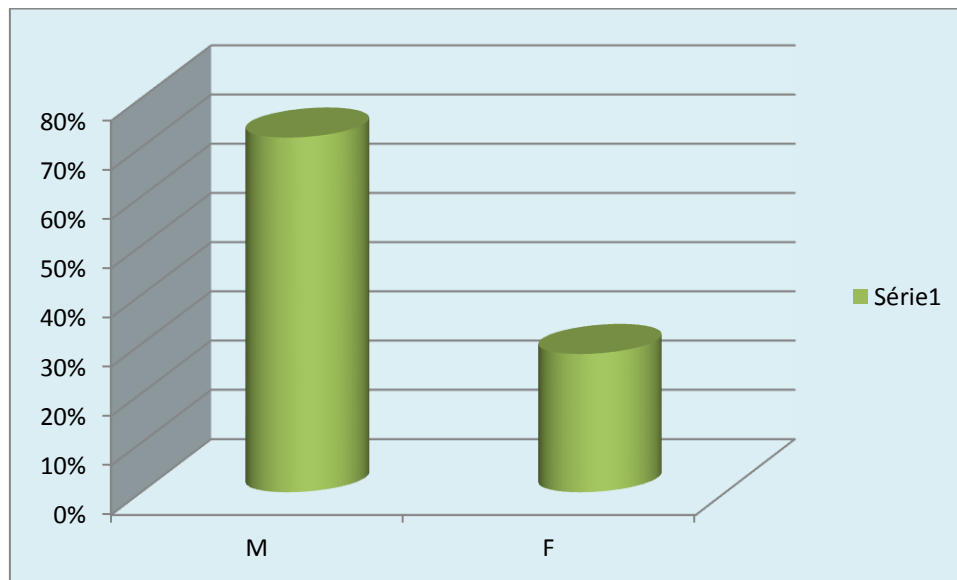


Figure 21. Répartition des souches selon le sexe chez *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*.

La figure 19 montre que le sexe prédominant est le sexe masculin avec un pourcentage de 72% cependant le sexe féminin est de 28%

1.3. Répartition des souches selon la mortalité

1.3.1. Cas de *Klebsiella pneumoniae*

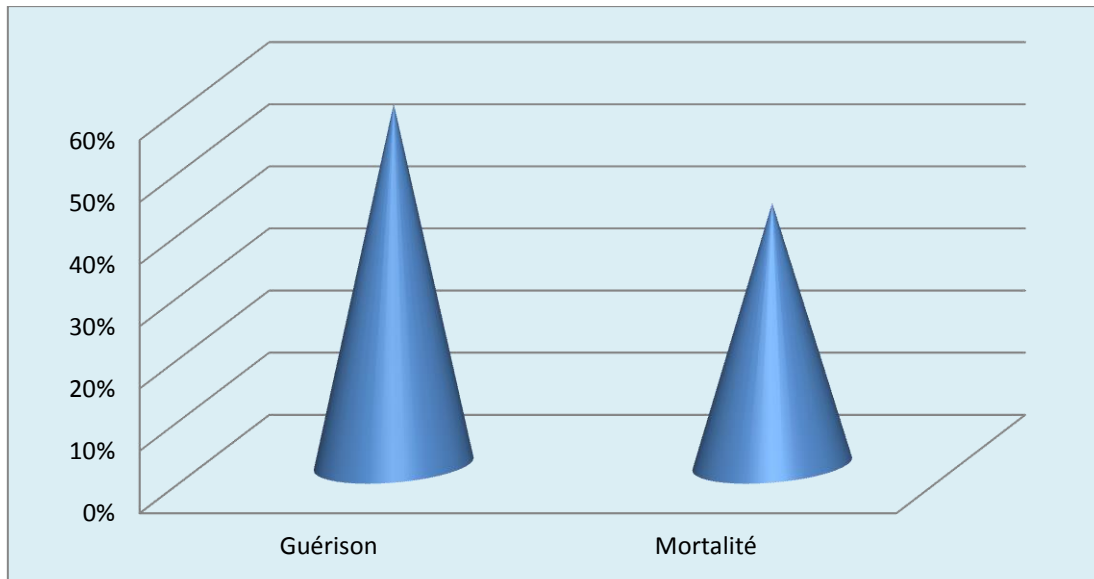


Figure 22. Répartition de souches selon la mortalité chez *Klebsiella pneumoniae*.

La figure montre un taux de mortalité de 42 % et une guérison de 58% .

1.3.2. Cas d'*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*

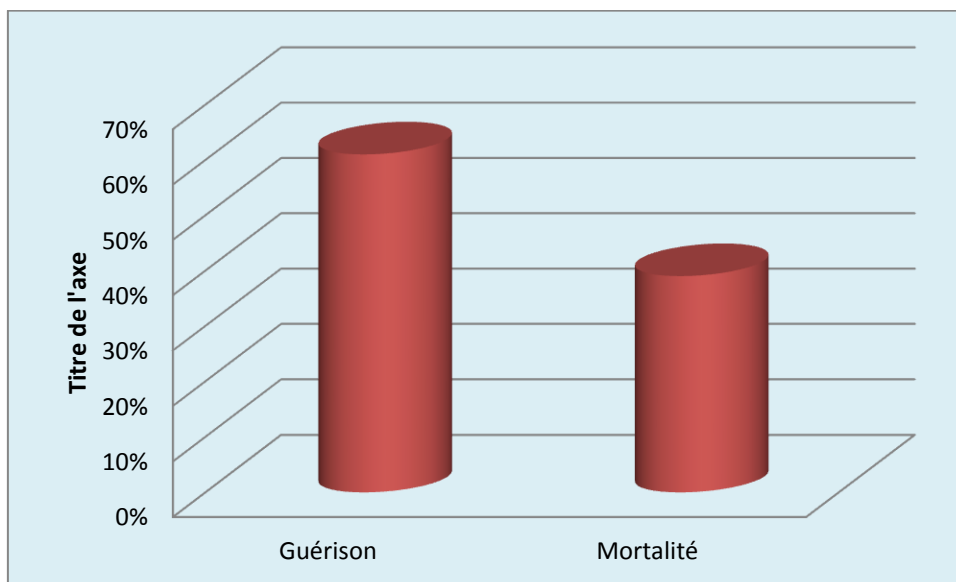


Figure 23. Répartition de souches selon la mortalité chez *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*.

La figure montre un taux de mortalité de 39% et une guérison de 61%.

1.4. Répartition des souches selon les pathologies causales

1.4.1. Cas de *Klebsiella pneumoniae*

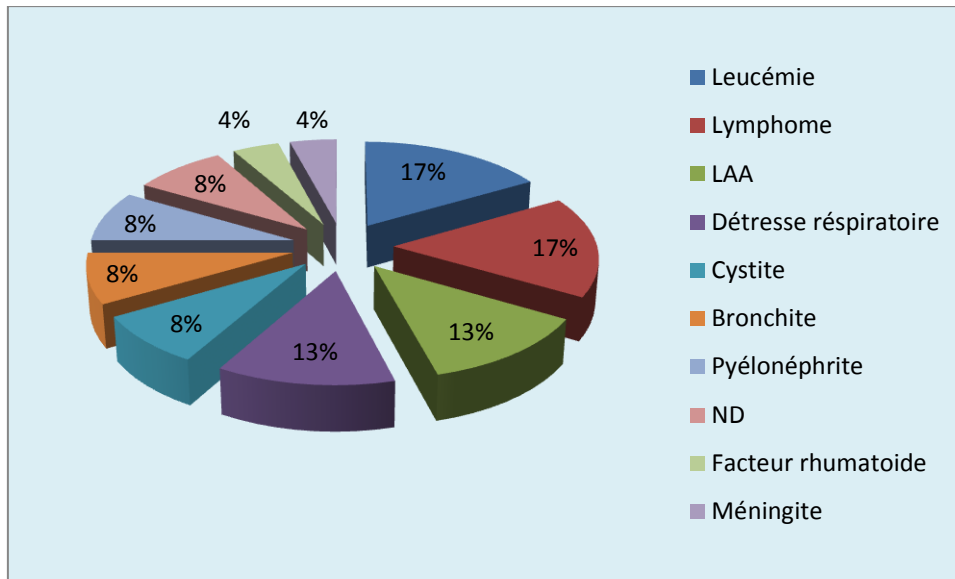


Figure 24. Répartition de souches selon les motifs d'hospitalisation chez *Klebsiella pneumoniae*.

A partir de la figure nous constatons divers types d'hospitalisations dont la leucémie et le lymphome qui dominent avec un pourcentage de 17% qui sont les pathologies les plus lourdes suivi de détresse respiratoire et de LAA avec 13% pour la cystite, bronchite et les causes non déterminées ont note 8% , en dernier on trouve la méningite et le facteur rhumatoïde qui représente 4%.

1.4.2. Cas de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*

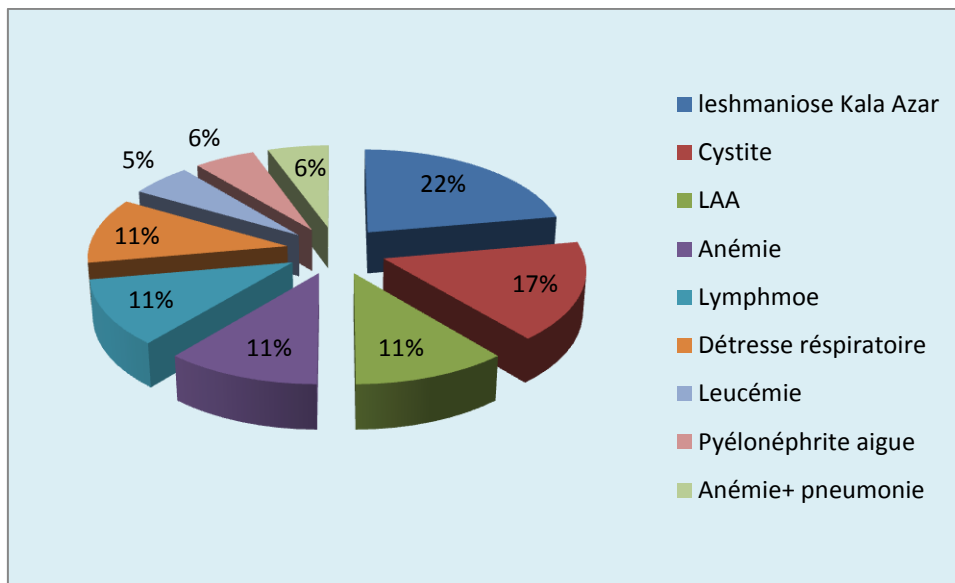


Figure 25.Répartition de souches selon les motifs d'hospitalisation chez *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*

A partir de la figure nous notons diverses cause d'hospitalisations dont la leishmaniose kala Azar est la plus fréquente avec un taux de 22% suivi de Cystite 17%, on note que LAA, l'anémie et la détresse respiratoire ont un taux de 6% en dernier en faible pourcentage nous avons la pyélonéphrite, l'anémie associée a une pneumonie et la leucémie avec 5%.

2. Sensibilité des souches aux antibiotiques

2.1. Cas de *Klebsiella pneumoniae*

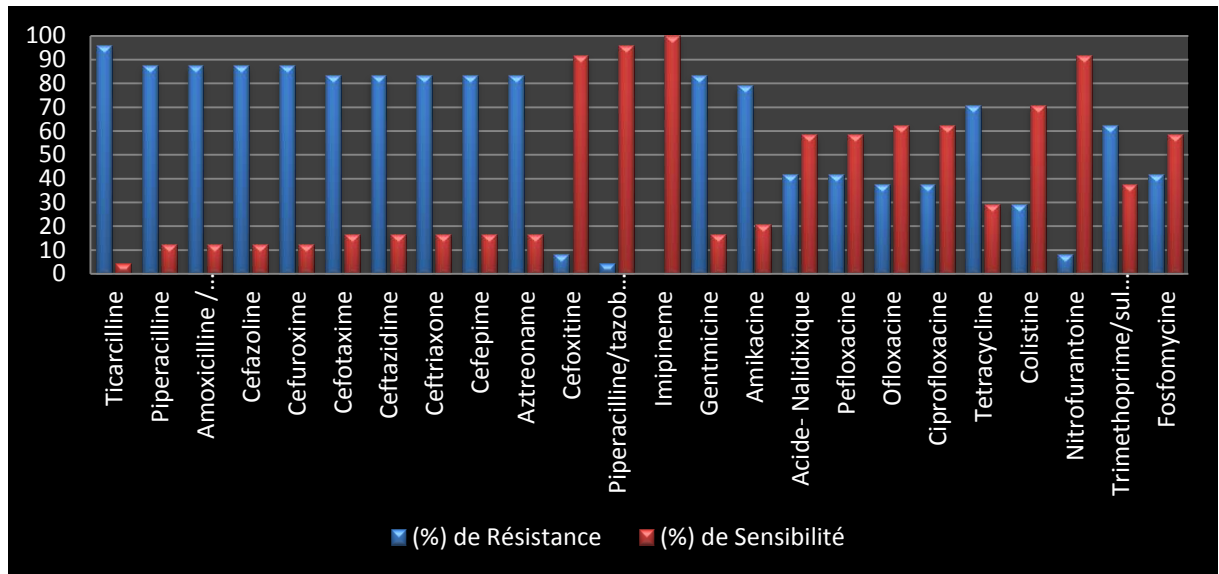


Figure 26. Profil de résistance aux antibiotiques des souches *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE isolées d'hémoculture.

L'étude de la résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* révèle des taux de résistance très élevés pour les céphalosporines : la ticarcilline (95,83%), suivi de la céfazoline, la piperacilline et l'amoxicilline/acide clavulanique (87,5%), enfin, le céfotaxime, la ceftazidime, la ceftriaxone, le céfépime et l'Aztréoname (83,33%).

Pour les aminosides, le taux le plus important a été observé pour la gentamicine, (83,33%), suivi de l'Amikacine (79,16%). En ce qui concerne les quinolones, les taux de résistance étaient les suivants: (41,66%) pour l'acide nalidixique et la pefloxacine et (37,5%) pour l'ofloxacine et la ciprofloxacine. Nous notons également un taux de résistance important pour le triméthoprim/sulfaméthoxazole avec (62,5%) et moyen pour la fosfomycine (41,66%).

En revanche une bonne activité du céfoxitine et de la colistine a été remarquée avec respectivement (91,66%) et (70,66%) de souches sensibles. Aucune résistance n'a été observée pour l'imipénème avec (100%) de souches sensibles.

2.2. Cas d'*Enterobacter cloacae*

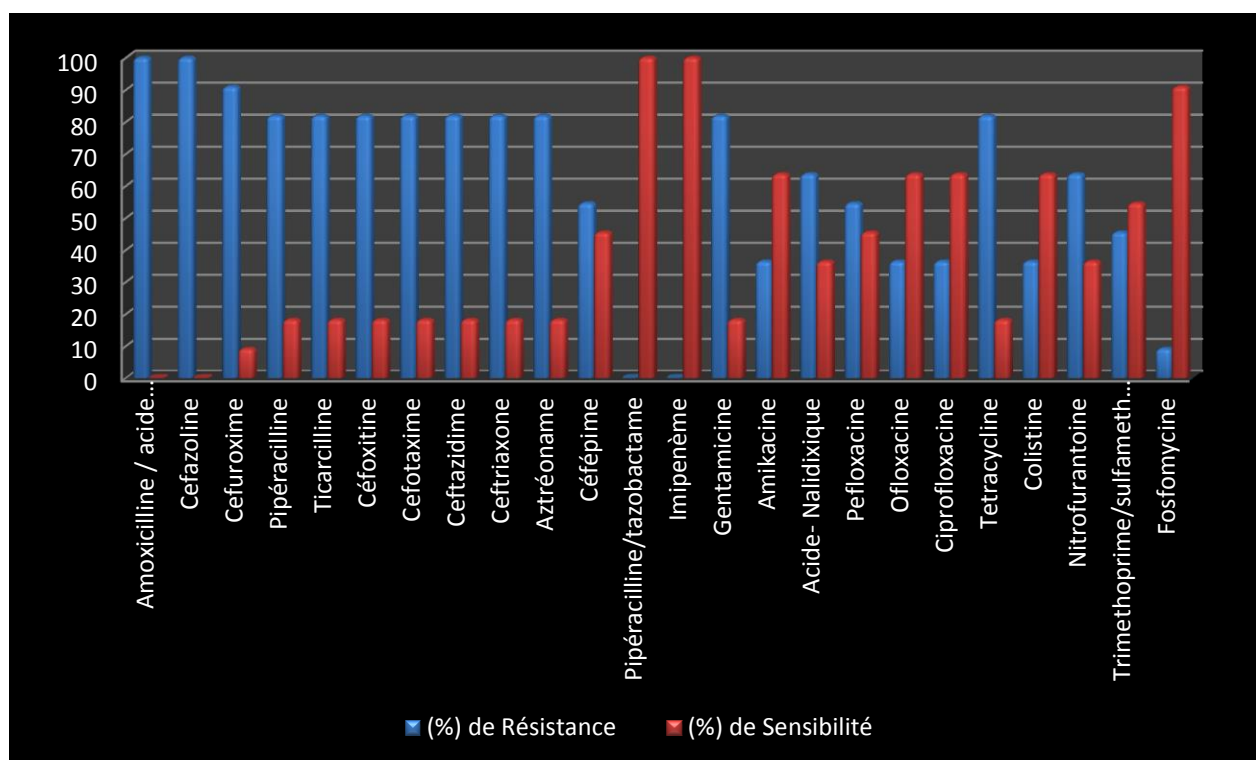


Figure 27. Profil de résistance aux antibiotiques des souches *d'Enterobacter cloacae*, productrices de BLSE isolées d'hémoculture

Les souches identifiées d'*Enterobacter cloacae* présentent une résistance complète vis-à-vis de la céfazoline, et l'amoxicilline/acide clavulanique, une résistance de 90% pour le céfuroxime, ainsi des taux très élevés pour la Pipéracilline, la Ticarcilline, la Céfoxitine le Cefotaxime, la Ceftazidime, le Ceftriaxone et l'Aztréoname (81,81%).

nous remarquons une résistance moyenne vis-à-vis du céfépime (54,54%).

Concernant les aminosides nous constatons que la gentamicine a une résistance de 81,81% et l'amikacine (36,36%)

Pour les quinolones nous avons une résistance de (63,63%) pour l'acide- Nalidixique, (54,54%) pour la Pefloxacine, ainsi un taux de (36,36%) pour l'Ofloxacine et la Ciprofloxacine.

En ce qui concerne les autres antibiotiques : la Tétracycline 81,81%, Nitrofurantoïne 63,63%, Triméthoprime /sulfaméthoxazole 45,45% et la Fosfomycine 9,09 %.

En revanche une bonne activité a été remarquée pour la colistine avec (63,63%) de souches sensibles

L'imipénème reste l'antibiotique le plus actif sur les souches d'*Enterobacter cloacae* avec une sensibilité totale de souches.

2.3.Cas d'*Escherichia coli*

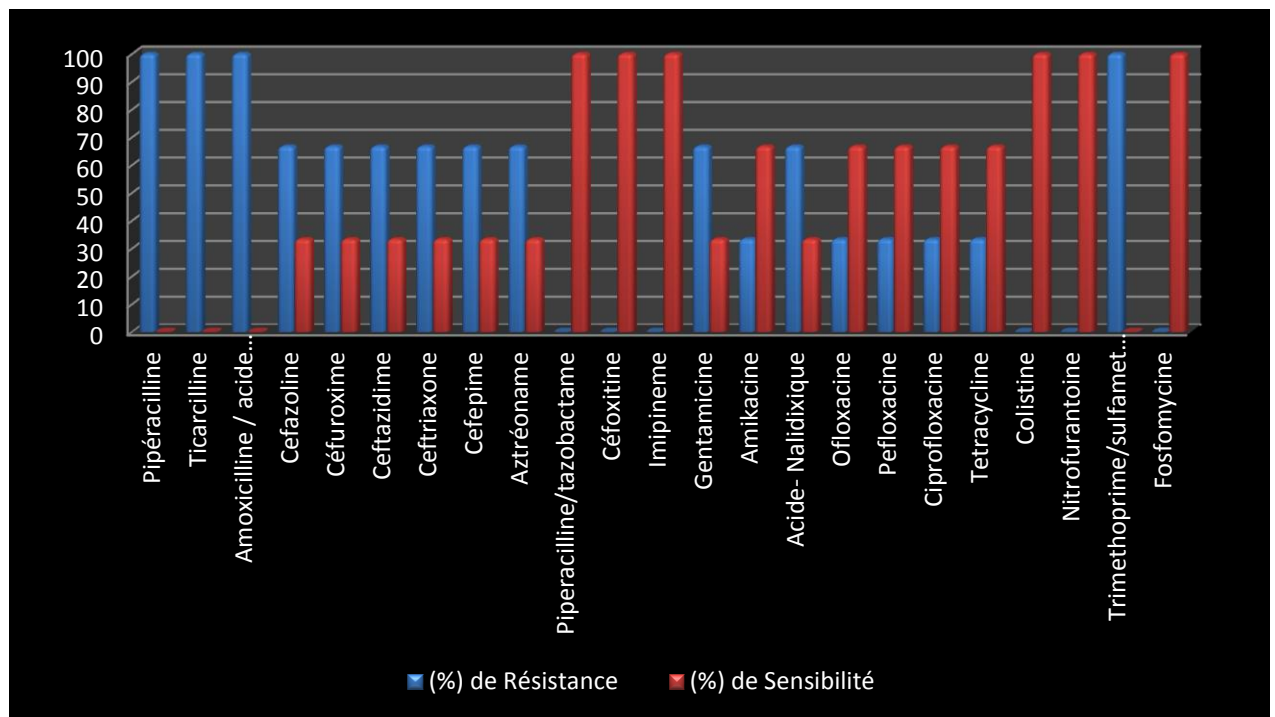


Figure 28. Profil de résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE isolées d'hémoculture

L'analyse du profil de la résistance des souches d'*Escherichia coli* montre des taux de résistance très élevés pour la plupart des antibiotiques utilisés ; avec un pourcentage de 100% pour la Pipéracilline, Ticarcilline et l'Amoxicilline / acide clavulanique.

Une résistance de 66,66% vis-à-vis de la Céfazoline, le Céfuroxime, la Ceftazidime, le Ceftriaxone, le Céfépime, et l'Aztréoname.

Une bonne récupération pour la Pipéracilline/tazobactame et de la Céfoxitine avec 100% de souches sensibles.

Concernant les aminosides le taux de la Gentamicine (66,66%), et l'Amikacine (33,34%).

Concernant les fluoroquinolones : l'Acide- Nalidixique 66.66 Ofloxacine, Pefloxacine, Ciprofloxacine, Tétracycline 33.34%.

Pour les autres antibiotiques la Colistine, Nitrofurantoïne, et la Fosfomycine ont un taux de 0% de souches résistantes.

Pour le Triméthoprime/sulfaméthoxazole nous remarquons une bonne récupération des souches avec 100% de souches sensibles

L'imipénème reste l'antibiotique de choix pour toutes les souches d'*Escherichia coli* isolées.

2.4.Cas de *Serratia marcescens*

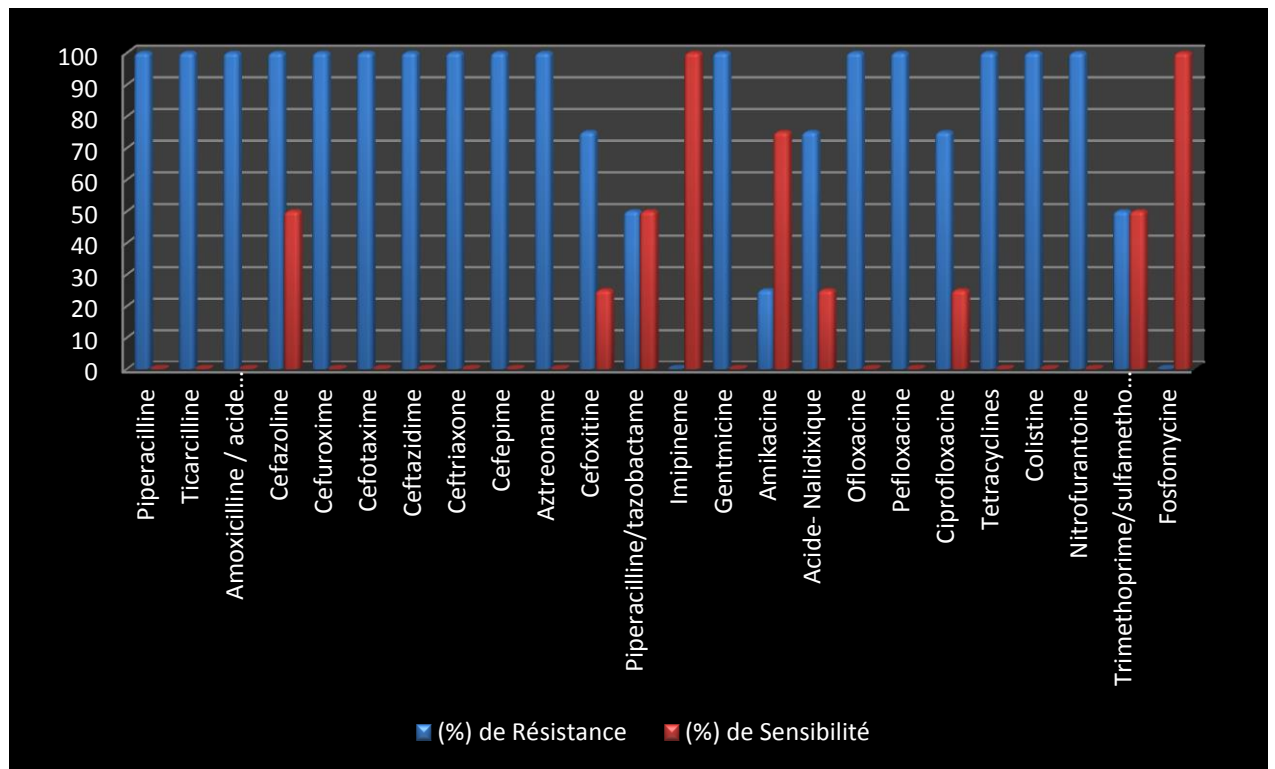


Figure 29. Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *Serratia marcescens* productrices de BLSE isolées d'hémoculture

L'analyse du profil de la résistance des souches de *Serratia marcescens* nous montre des taux de résistance très élevés pour la plus part des antibiotiques utilisés avec un pourcentage de

100% pour la pipéracilline, la ticarcilline, l'amikacine, la céfazoline, le céfuroxime, le céfotaxime, la ceftazidime, la ceftriaxone, l'aztréoname, et la gentamicine.

Un pourcentage élevé pour l'acide nalidixique, et la céfoxitine 75%, alors qu'un taux de résistance moyen a été obtenu pour l'association de la pipéracilline avec le tazobactame avec 50%, nous remarquons une résistance diminuée vis à-vis de l'amikacine 25%.

L'imipénème reste l'antibiotique de choix pour toutes les souches *Serratia marcescens* isolées.

3. Phénotype de résistance

3.1. Production de BLSE chez *Klebsiella pneumoniae*

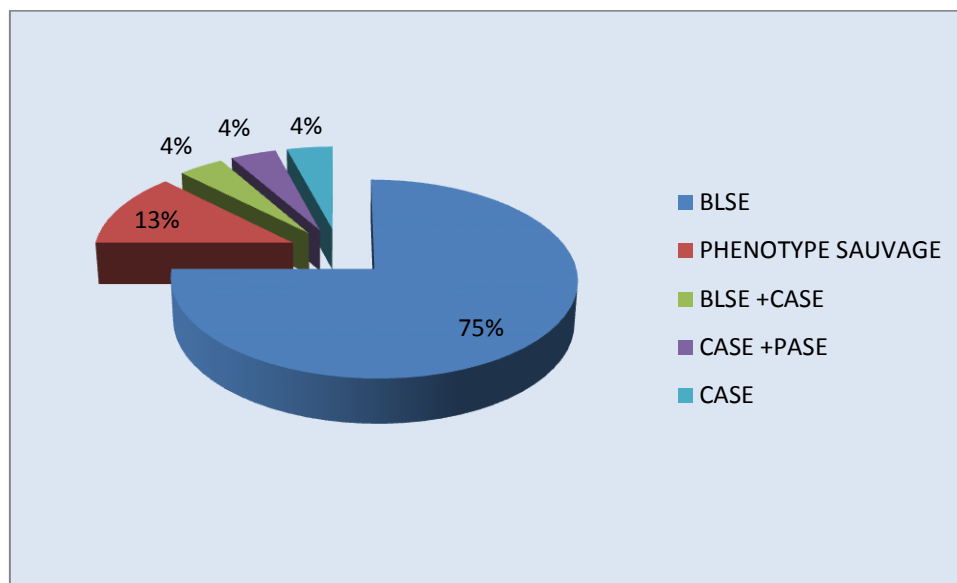


Figure 30. Répartition de souches selon le phénotype de BLSE chez *Klebsiella pneumoniae*

A partir de cette figure nous pouvons voir que le pourcentage de BLSE est le plus dominant avec un total de 75%, par ailleurs le phénotype sauvage représente 13%, l'isolement, de la céphalosporinase ainsi que la céphalosporinase associée à une pénicillinase et en dernier la céphalosporinase associée à une β -lactamase représentent un pourcentage faible de 4%.

3.2. Production de BLSE chez *d'Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*

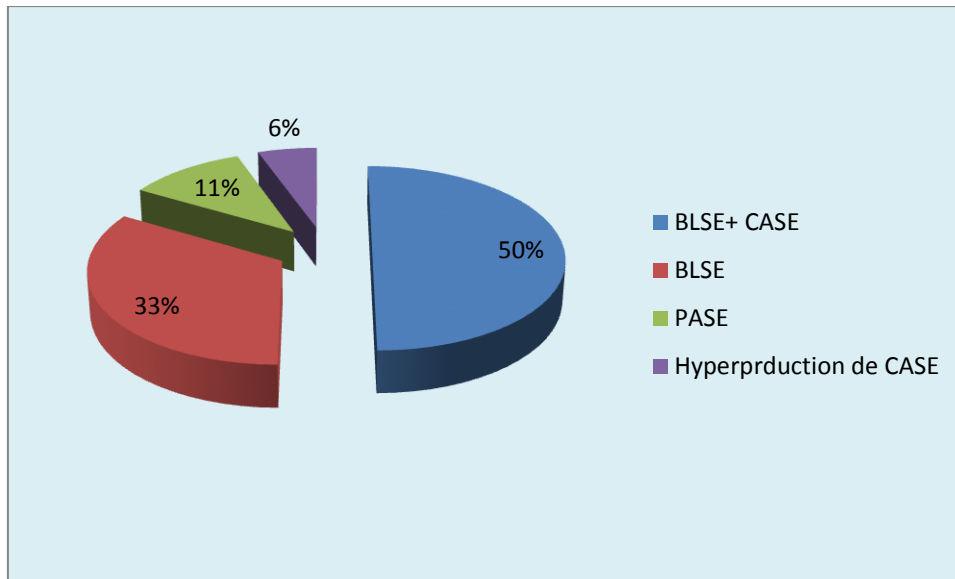


Figure 31. Répartition de souches selon le phénotype de BLSE chez *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*.

A partir de cette figure nous pouvons constater que le pourcentage de BLSE+CASE est le plus dominant avec un total de 50% suivi de 33% de phénotype BLSE, par ailleurs la pénicillinase ainsi que l'hyperproduction de la céphalosporinase représentent successivement 11% et 6%.

4. Profil moléculaire des souches isolées

4.1. Cas de *Klebsiella pneumoniae*

Après une électrophorèse sur gel d'agarose, les résultats de la PCR standard de détection des gènes codant les β -lactamases présentes dans cette souche (figures 33, 34, 35) montrent que Pour les 24 souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées, nous avons trouvé des souches contenant deux à trois gènes de résistance, certaines contenant un seul gène, et d'autres ne contiennent aucun gène de résistance et parmi ces résultats on peut citer :

-Huit souches possèdent le gène *bla*_{CTXM-15}, quatre souches possèdent le gène *bla*_{TEM1}

-Quatre souches possèdent le gène *bla*_{SHV12}, deux souches possèdent le gène *bla*_{SHV11} Une souche possède le gène *bla*_{SHV32}, une souche possède le gène *bla*_{SHV133}, deux souches possèdent le gène *bla*_{SHV28} (tableau12).

Nous remarquons dans notre étude qu'il y'a une prédominance du gène CTX-M mais aussi des gènes de résistance qui n'ont jamais été trouvé en Algérie jusqu'a ce moment de la rédaction du manuscrit.

Tableau 12.Caractérisation des isolats cliniques des souches de *Klebsiella pneumoniae* issus d'hémoculture

Profil du patient				Gérmes	Phénotype d'antibiotique	CTX-M	TEM	SHV	Suivi
code	Sexe	Age (mois)	Motif d'hospitalisation			Type	Type	Type	
[1]	M	2	Cystite	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	SHV-12	Guérison
[2]	F	3	Bronchite chronique obstructive	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	CTX-M-15	-	-	Guérison
[3]	M	5	FR	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	CTX-M-15	-	SHV-11	Guérison
[4]	M	6	LAA	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	CTX-M-15	-	SHV-12	Guérison
[5]	M	7	Pyélonéphrite aiguë	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	Guérison
[6]	M	9	Detresse respiratoire	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	SHV-32*	Décès
[7]	M	10	Leucémie	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	CTX-M-15	-	SHV-28*	Décès
[8]	M	10	LAA	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	SHV-11*	Guérison
[9]	M	12	LAA	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	-	Guérison
[10]	F	18	Lymphome	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	SHV-133*	Décès
[11]	F	24	ND	<i>K. pneumoniae</i>	CASE	CTX-M-15	-	-	Guérison
[12]	M	24	Detresse respiratoire	<i>K. pneumoniae</i>	Phénotype sauvage	-	-	SHV-28	Décès
[13]	F	30	Leucémie	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	-	Décès
[14]	M	36	Leucémie	<i>K. pneumoniae</i>	CASE+PASE	-	TEM-1	-	Décès
[15]	M	48	Lymphome	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	-	Décès
[16]	M	48	Lymphome	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	-	Décès
[17]	M	48	Bronchite chronique obstructive	<i>K. pneumoniae</i>	Phénotype sauvage	-	-	-	Guérison
[18]	M	60	Méningite	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	-	Guérison
[19]	M	60	Cystite	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	TEM-1	SHV-28	Guérison
[20]	F	72	Pyélonéphrite aiguë	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	-	-	Guérison
[21]	M	72	Lymphome	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE+CASE	CTX-M-15	-	-	Guérison
[22]	M	156	Detresse respiratoire	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	CTX-M-15	-	-	Décès
[23]	M	168	ND	<i>K. pneumoniae</i>	Phénotype sauvage	-	-	-	Guérison
[24]	M	3.3	Leucémie	<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	-	TEM-1	SHV-12	Décès

4.2. Cas d'*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*

Après une électrophorèse sur gel d'agarose, les résultats de la PCR standard de détection des gènes codant les β -lactamases présentes dans ces souche (figures 33, 34, 35) montrent que Pour les 11 souches d'*Enterobacter cloacae* étudiées, nous avons trouvé des souches contenant deux a trois gènes de résistance, certaines contenant un seul gène, et d'autres ne contiennent aucun gène de résistance et parmi ces résultats on peut citer :

Deux souches possèdent le gène *bla*_{CTX-M-15}

Neuf souches possèdent le gène *bla*_{TEM-1}

Une souche possèdent le gène *bla*_{TEM-136}

Cinq souches possèdent le gène *bla*_{SHV-12}

Après une électrophorèse sur gel d'agarose, les résultats de la PCR standard de détection des gènes codant les β -lactamases présentes dans Pour les 3 souches *Escherichia coli* montrent

-Une souche possède le gène *bla*_{TEM-1}

Après une électrophorèse sur gel d'agarose, les résultats de la PCR standard de détection des gènes codant les β -lactamases présentes dans les quatres souches de *Serratia marcescens* montrent qu'aucune souche ne possède les trois gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} et *bla*_{SHV}.

Tableau 13. Caractérisation des isolats cliniques des souches de *E. cloacae*, *E. coli* et *S. marcescens* issus de prélèvement sanguins.

Profil du patient						CTX-M	TEM	SHV	Suivi
code	Sexe	Age (mois)	Motif d'hospitalisation	Germe	Phenotype d'antibiotique	Type	Type	Type	
[25]	F	3	Cystite	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	guérison
[26]	F	5	Leishmaniose kala-azar	<i>E. cloacae</i>	PASE		-	-	guérison
[27]	F	5	LLA	<i>E. cloacae</i>	BLSE		TEM-1	-	guérison
[28]	M	5	Anemie	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE		TEM-1	-	guérison
[29]	M	8	pneumonie + Anemie	<i>E. cloacae</i>	CASE HYPER PRODUCT		TEM-1	SHV-12	guérison
[30]	F	24	Leishmaniose kala-azar	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE	CTX-M-15	TEM -136*	SHV-12	décès
[31]	M	24	Pyelonephrite aigue	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE		TEM-1	-	décès
[32]	M	36	Detresse respiratoire	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE		TEM-1	-	décès
[33]	M	36	Cystite	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE		TEM-1	SHV-12	décès
[34]	M	48	Lymphome	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE		TEM-1	SHV-12	décès
[35]	M	108	Leucemie	<i>E. cloacae</i>	BLSE+CASE		-	-	décès
[36]	M	2	Leishmaniose kala-azar	<i>E. coli</i>	BLSE		-	-	décès
[37]	M	24	Leishmaniose kala-azar	<i>E. coli</i>	PASE		TEM-1	-	guérison
[38]	F	168	LLA	<i>E. coli</i>	BLSE		-	-	guérison
[39]	M	8	Cystite	<i>S. marcescens</i>	BLSE+CASE		-	-	guérison
[40]	M	8	Detresse respiratoire	<i>S. marcescens</i>	BLSE		-	-	décès
[41]	M	12	Lymphome	<i>S. marcescens</i>	BLSE+CASE		-	-	décès
[42]	M	12	Anemie	<i>S. marcescens</i>	BLSE		-	-	guérison

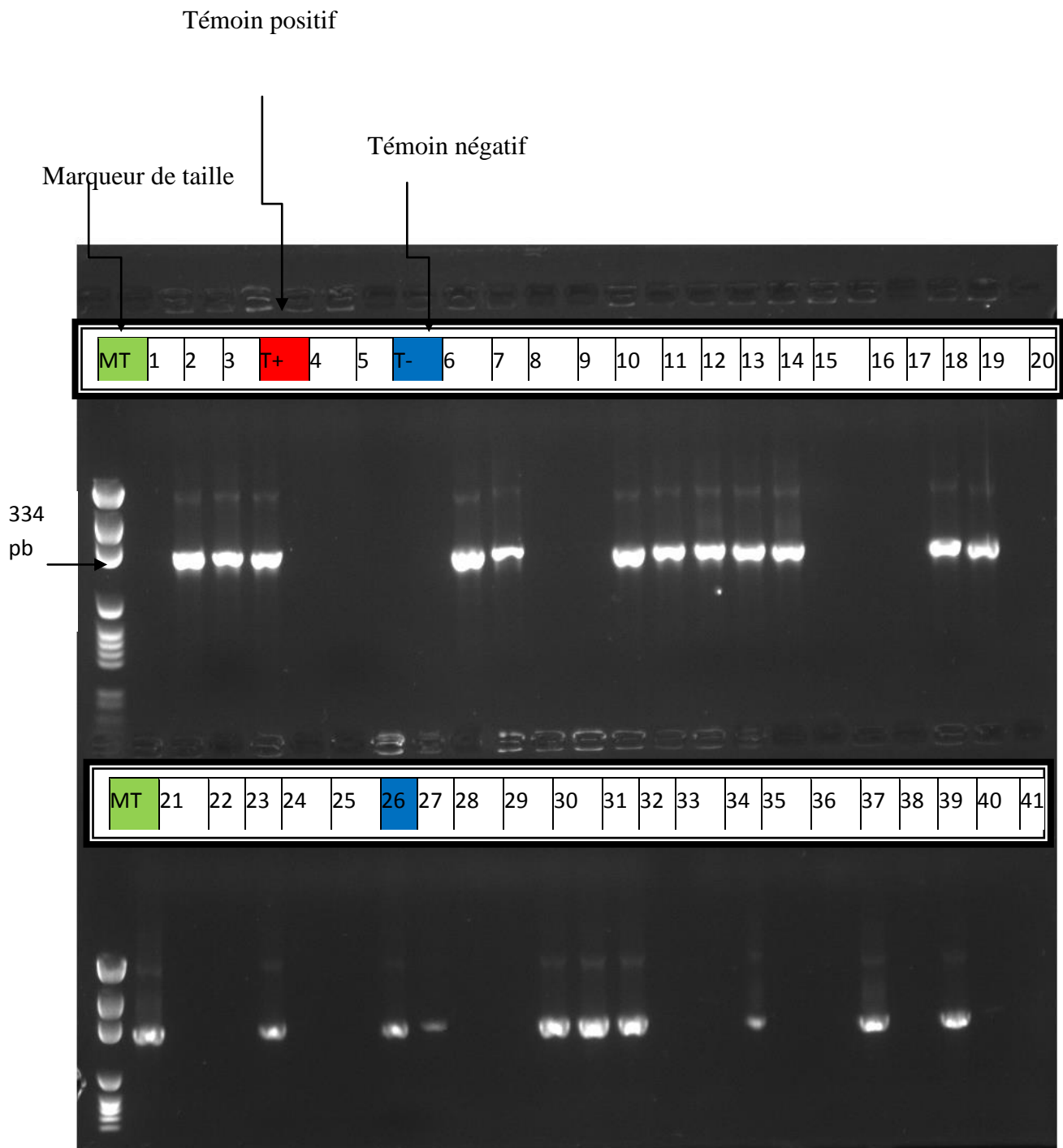


Figure 32. Représentation de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène blaCTX-M des 42 souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*.

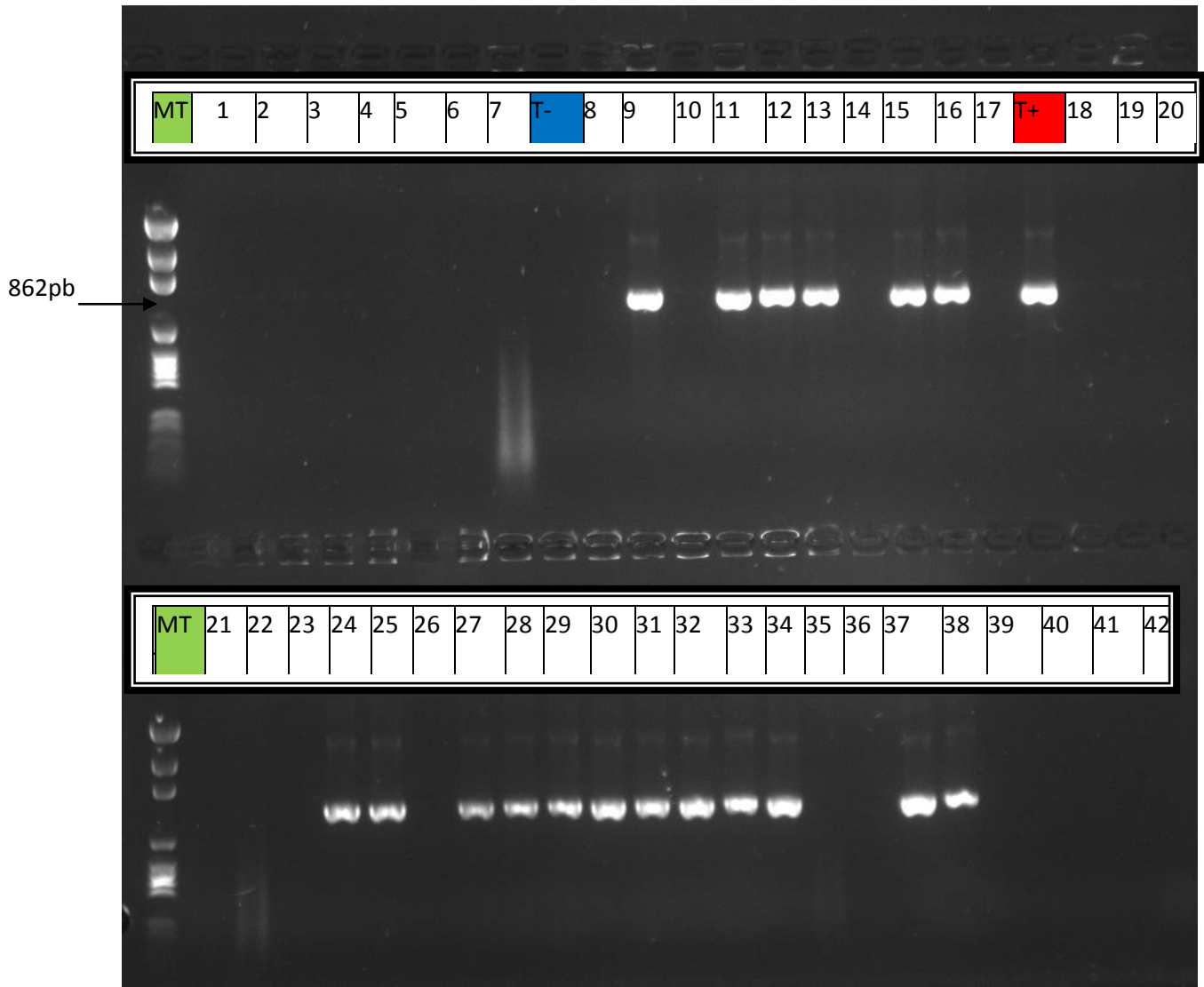


Figure 33. Représentation de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène blaTEM des 42 souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*.

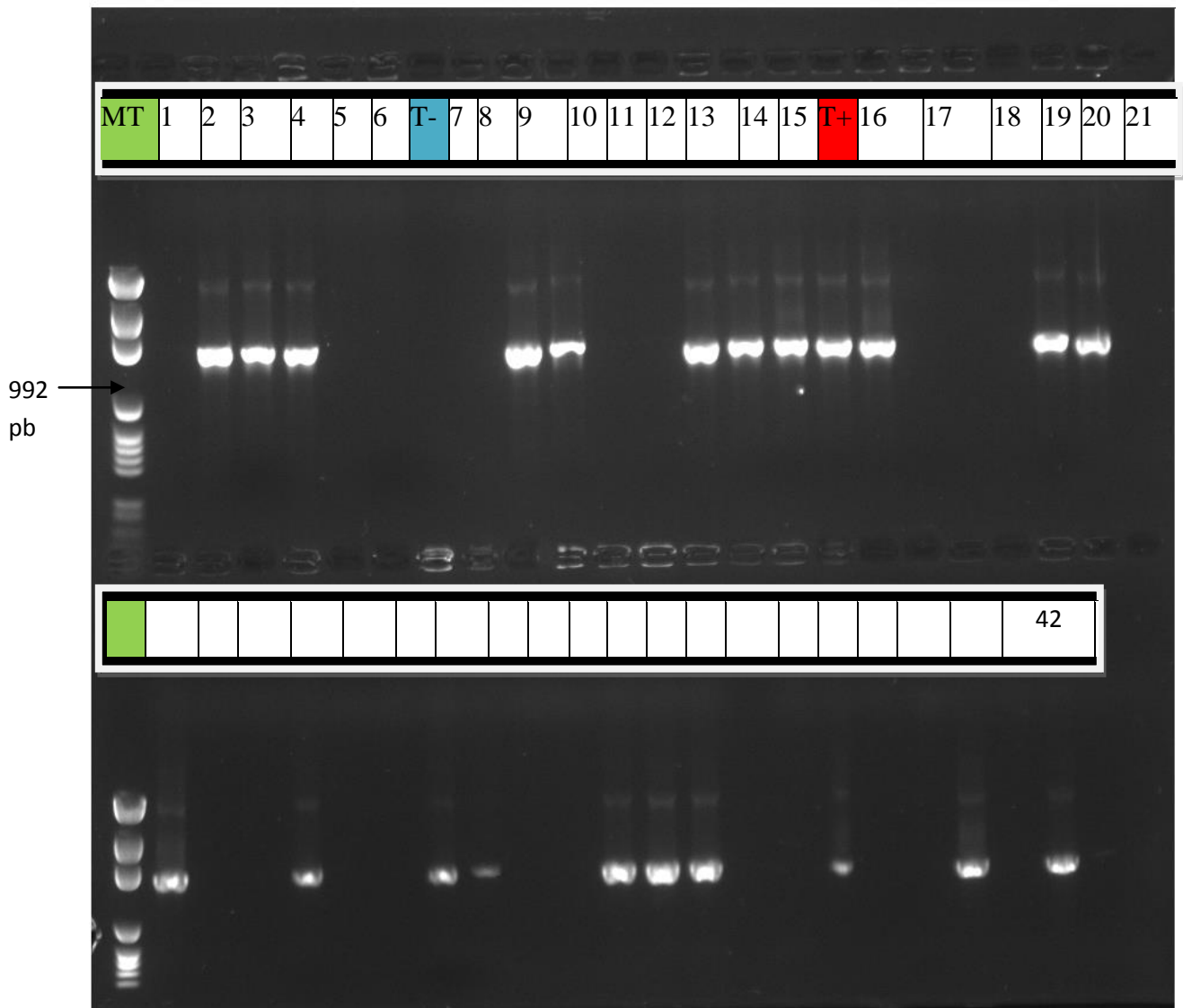


Figure 34. Représentation de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène blaSHV des 42 souches *de Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, et Serratia marcescens*

Discussion

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram-négatif, particulièrement les Entérobactéries, représentent un problème majeur de santé publique (**soussy 2007et al**). La situation apparait particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. Et principalement en unité de soins intensifs ou la septicémie est la première cause de mortalité en pédiatrie (**Carcillo, 2005**) et elle atteint plus de 50% dans les pays en voie de développement. (**Khan et al., 2012**).

Concernant notre étude nous avons identifié 42 souches d'entérobactéries des enfants septicémiques au sein de hôpital pédiatrique Sainte- Thérèse ou nous avons trouvé 24 *Klebsiella pneumoniae*, 11 *Enterobacter cloacae*, 4 *Serratia marcescens*, et 3 *Escherichia coli* Nos résultats ont été comparés à une étude faite en 2012 à FES au Maroc (**Lahlaoui et al., 2012**) qui a révélé un taux de 47% d'*Enterobacter cloacae*, 26% de *K. pneumoniae* et 5.6 % d'*E.scherichia coli*.

Nous constatons un plus grand taux de *K. pneumoniae* ce qui concorde avec l'étude publiée par l'agence de la santé publique du canada en septembre 2011 qui révèle que les espèces du genre *Klebsiella* sont d'importants pathogènes communs, à l'origine de pneumonies nosocomiales (7 à 14 % de tous les cas), de septicémies (4 à 15 %), d'infections urinaires (6 à 17 %), d'infections de plaies (2 à 4 %), d'infections survenant dans les unités de soins intensifs (USI) (4 à 17 %) et de septicémies néonatales (**Abbott, 2006**).

▪ Sexe des patients

Concernant le sexe des patients isolées, nous avons constaté que le sexe masculin est prédominant pour toutes les souches et principalement *K.pneumoniae* ou elle atteint 79% de souches masculines, dans notre cas le sexe semblerait un facteur de risque pour l'infection par *K.pneumoniae* en effet sur les 24 isolats *K.pneumoniae*, 5 proviennent de patients de sexe féminin et 19 de patients de sexe masculin, 21% contre 79%. Ces résultats concordent avec ceux de Colodner et al 2004 qui rapportent qu'il y'a augmentation significative chez le sexe masculin ce même auteur ajoute aussi, avoir pris des antibiotiques à large spectre constituent d'autres facteurs de risque pour l'infection par des *K.pneumoniae* BLSE+. Ces facteurs de risque sont également rapportés par (**Lautenbach et al., 2001; Tumbarello et al.,2006**).

▪ Mortalité des patients

La mortalité globale dans la présente étude est de (45,23%), au total , 19 cas de septicémie sont décédés , 10 (23,80%) de ces enfants étaient atteints de lymphome et leucémie sont

mort après un choc septique , 7(16.66%)de ces patients atteint de leucémie lymphoblastique aiguë et détresse respiratoire sont morts après un sepsis sévère , 2 (4,71%) avec la méningite et la fièvre rhumatismale sont morts 7 jours après l'épisode séptique.

la mortalité liée était de 30.95% pour e *Klebsiella pneumoniae*, 9.85%, pour *Enterobacter cloacae* et 4.76%, pour *Serratia marcescens* , nous avons constaté que le taux de mortalité chez les enfants septiques dans la présente éludé était significativement plus élevée par rapport aux résultats signalés dans d'autres études soit de 1,6% à 4 % et 2 % à 3 % respectivement (Leclerc et al., 2005), avec 11,7 cas mortels au Koweït (**Hammoud et al., 2012**). avec 17 % au Royaume-Uni (**Inwald et al., 2009**), à Taiwan avec 20 % des 100 enfants mort (**Wu et al., 2005**), et 24 % au Pakistan (**Khan et al., 2012**).

Le taux de mortalité est très élevé et ceci est préoccupant surtout quand il s'agit d'enfants en bas âge ou nous avons noté 19 cas décédés avec un taux de 45,23% ou la souche de *Klebsiella pneumoniae* est la plus dominante avec 48% de mortalité, d'après Navon-Venezia S et ses collaborateurs, qui ont rapporté dans leur étude que les septicémies causées par les souches *K.pneumoniae* sont retrouvées associées à une mortalité plus élevée que celle causées par des souches *K.pneumoniae* non productrices de BLSE ceci concorde avec notre étude ou le taux de mortalité est de 42%, ceci revient a plusieurs facteurs notamment la durée d'hospitalisation, et ceci est confirmé par une étude comparative menée entre 1991 et 2007 en France qui montre que le taux de mortalité est en nette évolution selon la durée de l'hospitalisation.

Nous démontrons également que la septicémie provoquée par ces entérobactéries est associée à des taux de mortalité très élevés (**Blomberg et al., 2005**).

Les patients atteints de sepsis dû à des souches productrices de BLSE ont un taux de mortalité nettement supérieur à ceux des souches non-productrices de BLSE. La prescription de plusieurs types de β -lactamases, en particulier C3G; l'automédication; un long séjour à l'hôpital; la fin de l'initiation du traitement approprié; chimiothérapie inapproprié; la présence d'une veine centrale, une ventilation mécanique; et un temps plus long pour l'admission à la culture de sang ont été les principaux facteurs de risque importants pour l'infection à BLSE et significativement associée à une issue fatale. Il n'y avait pas de facteur de risque indépendant associé à un taux de

mortalité plus élevé (Tuon et al, 2011; Hsieh et al, 2010). Le taux d'hospitalisation pour sepsis a presque doublé dans la dernière décennie (Khan et al., 2012).

En revanche une étude multicentrique internationale de bactériémies dues à des *K.p* BLSE+ montre que la mortalité était significativement réduite suite à l'utilisation de carbapénèmes durant les cinq premiers jours (Rahal, 2000).

▪ Pathologies causales

Les pathologies causales étaient 26,19% pour leucémie, 14,28% pour lymphome, 11,19% pour chacune de détresse respiratoire et de cystite, 9,52% pour leishmaniose viscérale, 7,14% pour pyélonéphrite, 4,76% uniformément pour anémie, bronchite obstructive chronique et causes non déterminées, 2,38% pour la fièvre rhumatoïde et de 3,83% pour méningite.

Ces résultats ont été comparés à une étude faite en 2009/2010 à Tunis(Menif et al., 2009) qui a révélé un taux de 23,87% pour les maladies de l'appareil respiratoire, 19% pour maladies infectieuses et respiratoires 13,87% affections dont l'origine se situe à la période périnatale, 8,96% lésions traumatiques et empoisonnements, 3,13% maladies du sang et du système immunitaire.

Nous remarquons un plus grand taux de leucémie et de lymphome qui a été retrouvé dans notre étude ceci peut être du à la recrudescence de ces pathologies ces derniers temps.

Ce qui confirme par une étude réalisée par l'Institut de veille sanitaire (InVS), l'Institut national du cancer (INCa), les Hôpitaux de Lyon le 8/10/2013 (le parisien).

▪ Phénotype de résistance

La DDST a été détectée dans 34 souches donc 80,95 % ont été définies comme étant (BLSE); 15 des 34 patients ayant BLSE+ (44,11%) meurent à l'hôpital 20 jours après l'admission et les 4 autres patients BLSE- meurent 10 jours après l'admission. Parmi les 42 souches d'Entérobactéries collectées ; 34 avaient un phénotype BLSE par conséquent 80.95% des isolats ont été définis comme étant des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) selon la méthode de synergie de double disque ou l'on note : 100% des souches *S. marcescens* (n = 4), présentaient une BLSE 81,81% souches *E. cloacae* (n = 11), 79,16% des souches *K. pneumoniae* (n = 19), 66,66% des souches *E. coli* (n = 3).

Ainsi 80, 95% des souches étudiées sont productrices de β -lactamases à spectre étendu. Cette valeur est nettement supérieure à celle retrouvée à Tlemcen (**Ayad, 2010**) (67%), et de celle obtenue en Tunisie (30.8 %) (**Messai et al., 2007**) et en Egypte 38.5% à celle rapportée en France 5.2%, en Allemagne 2.6% et en Hollande 2% (**Ho et al., 2000; Bouchillon et al., 2004**).

Nous remarquons dans notre étude que le taux des BLSE est très élevé ainsi il atteint les 79,16% et ceci concorde ou même dépasse les études qui ont été faites par Sahly et al 2004 qui rapportent que l'incidence des souches de *K.pneumoniae* BLSE+ varie de 8% en Amérique du nord à 45% en Amérique Latine et 23% en Europe, avec une prévalence dominante aux USI, avec des taux allant de 9% au sud de l'Allemagne à 40% en France, 49% au Portugal et 59% en Turquie.

Au CHU de Constantine, en 2002, sur 350 *K.pneumoniae* hospitalières, 67.3% sont des *K. pneumoniae* BLSE, en 2004 la fréquence diminue légèrement pour atteindre 65%. Entre 2005-2006 le taux des *K. pneumoniae* BLSE +diminue à 56% (AARN) ces chiffres restent considérables.

Au niveau national, l'AARN indique une incidence de 40.2% de *K. pneumoniae* BLSE+.

En Afrique, dans une étude multicentrique tunisienne regroupant 3 CHU, où 1110 souches pathogènes de *K.pneumoniae* ont été collectées, 75% présentaient une BLSE (**Boutiba-Ben.Boubaker et al., 2002**). De même dans une étude multicentrique au Caire (Egypte) regroupant 5 hôpitaux, sur 149 isolats de *K.pneumoniae* 65% étaient résistants au cefotaxime et 60% à la ceftazidime (**El Kholy et al., 2002**), ces deux antibiotiques sont les marqueurs principaux pour la production de BLSE (**Villegas et al., 2004; De Silva et al., 2006; Valvedre et al., 2008**).

Dans les hôpitaux du sud de l'Europe, la prévalence au niveau des *Klebsiella* BLSE+ atteint les 25%, tandis que parmi les consultants externes elle est estimée à 4% (**Zingg 2008**).

Aux USA une fréquence de 6% est enregistrée parmi les externes (**Hesltine, 2000**).

En Corée la prévalence de *K.pneumoniae* BLSE est de 30% (**Kim et al., 2007**).

Dans certains pays, la prévalence approche 50%, avec des taux particulièrement élevés en Europe de l'Est et en Amérique latine (**De Raffles et al., 2003; Paterson et al., 2004**).

En Italie dans une étude nationale 3,5% d'Entérobactéries communautaires étaient des BLSE+, avec 2,6% de *K.p.* (**Luzzaro et al., 2006**).

Dans une étude prospective de 455 épisodes consécutifs de bactériémies à *K.pneumoniae* dans 12 hôpitaux de 7 pays, 85 épisodes étaient dus à un organisme producteur de BLSE (**Paterson et al., 2004**).

D'après une étude faite par patrice (Nordman.P, 2013), la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines mais épargnant les carbapénèmes est principalement le fait de souches porteuses du plasmide CTX-M qui ont émergé dans les années 2000. Le réservoir est communautaire, très important en Asie où dans certains pays ; plus de 50 % des souches d'*Escherichia coli* sont productrices de BLSE. En Europe, le pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* porteurs de BLSE est passé de moins de 10 % en 2005 à 30-40 % en 2011. Ces souches sont très souvent multi résistantes. Elles sont responsables principalement d'infections urinaires et de diarrhées, et le portage fécal est fréquent. Les souches BLSE peuvent aussi être responsables d'infections graves. On estime qu'aux États-Unis, elles sont responsables de 1 700 décès/an.

Ces résultats nous informent sur la situation nationale globale en matière de résistance dans nos hôpitaux, qui est très préoccupante. La situation dans les hôpitaux nationaux ciblés ne semble pas maîtrisée.

Depuis plus de 20 ans, la résistance des entérobactéries aux C3G ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de β -lactamases à spectre élargi (**Belmonte et al., 2010**) et les infections causées par les *K.pneumoniae* BLSE présentent un risque accru d'échec thérapeutique et sont associées à des hospitalisations prolongées et des surcoûts liés aux soins (**Talon, 1999; Stone-Patricia et al., 2003; Rodriguez et Struelens, 2006**).

Cependant nous remarquons que le nombre des souches productrices de BLSE est plus important chez *Enterobacter cloacae* avec 81.81% qui correspond aux résultats obtenus par (**Sekhsokh 2008**) et par (**Edelstein et al.2003**), arrive en 2eme place *Klebsiella pneumoniae* avec 79.16% Ce taux est supérieur à celui rapporté en France par Belmonte et al,2010 (39%) et par Doit et al. 2010 (18%).

Nous notons également un taux de production de BLSE de 66.66% pour les souches d'*Escherichia coli* ce qui concorde avec plusieurs études réalisées par (**Leotard et Negrin,**

2010) et (**Holstein et al. 2010**) par rapport aux résultats obtenus aux États-Unis (9.5 %) (Saurina et al., 2000), en Italie (8.8 à 10 %) (**Pagani et al., 2002**) et en France (10.2%) (**Mahamat et al., 2006**).

- **Résistance aux antibiotiques**

L'étude de la sensibilité des entérobactéries aux C3G, montrait des taux de résistances acquises moyenne à l'hôpital (**Ayad, 2010**), et les niveaux de résistances obtenus sont plus élevés que ceux rapportés en Algérie (**Amazian et al.,2006**), en Tunisie (**Boutiba et al., 2004**), en Australie, en France, en Argentine (**Navon-Venezia et al., 2003; Masterton et Turner, 2006**) et dans certains pays asiatiques ; Inde , et Chine (**Hirakata et al., 2005**).

En Europe, la prévalence en France, en Italie et au Portugal est entre 20 et 30%, en Scandinavie, en Espagne, aux Pays-Bas et en Allemagne, elle est nettement plus faible avec une prévalence comprise entre 5 et 10% (EARSS. 2008).

En outre, le problème lié aux BLSE est surtout la présence fréquente de co résistances rendant les souches multirésistantes (**Leotard et Negrin, 2010**), en effet, les BLSE sont généralement portées par de grands plasmides qui portent aussi des gènes de résistance aux classes d'antibiotiques non β -lactamines, tels que les aminoglycosides, les quinolones et le triméthoprim/sulfaméthoxazole. Aussi, l'utilisation de ces antibiotiques contribue à la sélection de souches productrice de BLSE (**Paterson et Bonomo, 2005**).

Les quinolones montrent une activité moyenne, la sensibilité globale des souches chutant considérablement dans le cas des souches productrices de BLSE. Pour la majorité des souches, la résistance acquise est la conséquence d'une mutation, ce qui limite sa diffusion (**Larabi et al., 2003**).

Une activité faible est détectée pour le triméthoprim/sulfaméthoxazole, qui reste supérieur à celui décrit dans la littérature par plusieurs études (**Ammari et al., 2001; Kahlmeter, 2003; Guneyssel et al., 2009**) dont l'évolution de la résistance à cette molécule a été marquée par une décroissance significative.

Cela est vraisemblablement lié à une moindre utilisation de cet antibiotique en pratique courante (**Mahamat et al., 2006**).

En ce qui concerne la colistine, c'est l'une des molécules gardant les taux de sensibilité les plus élevés.

Les niveaux des résistances bactériennes varient d'un pays à l'autre et d'une année à l'autre. Aussi, la connaissance de la situation locale et de son évolution sont nécessaires pour le choix de l'antibiothérapie de première intention (**El Bakkouri et al., 2009**). En effet, nos résultats montrent un taux de résistance considérable à la majorité des antibiotiques testés. Les entérobactéries résistantes aux C3G occupent une place importante dans les infections nosocomiales, notamment en milieu de réanimation.

Ces bactéries deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques et commencent à franchir les limites de l'hôpital pour émerger dans la communauté.

La dissémination de ces bactéries présente une menace grave qui met en cause la validité de l'arsenal antibiotique actuellement disponible, d'autant plus qu'aucune classe nouvelle d'antibiotique n'est attendue dans les prochaines années (**Mkaouar, 2008**).

Les données de nombreuses études ont montré que l'exposition aux céphalosporines à large spectre est un facteur de risque pour l'émergence de la résistance à ces produits (**Harbarth et al., 2001; Arlet et Phillipon, 2003**). Ceci est particulièrement problématique, puisque le Développement de la résistance aux C3G est associé avec l'augmentation de mortalité, de la durée d'hospitalisation, et l'augmentation des charges hospitalières (**Astagenau et Lepoutre, 2002; Eckert et al., 2004; Bonnet, 2004; Bailly et al., 2004; Duck et al., 2004**).

Par ailleurs les souches résistantes aux C3G sont multi résistantes. Cette multi résistance fait que les cliniciens sont amenés, notamment dans les infections graves et plus particulièrement en réanimation, à utiliser des molécules de plus en plus puissantes, en particulier l'imipénème.

Les carbapénèmes sont les traitements de choix des infections sévères causées par les entérobactéries productrices de BLSE (**Gülmez et al., 2008**). La résistance des entérobactéries à ces molécules reste encore un phénomène marginal comme en témoignent les données épidémiologiques obtenues pour un grand nombre de souches, avec des pourcentages de sensibilité de 99-100 % (**Wolff et al., 2008**).

Dans notre étude, 0% des souches présentent une résistance à l'imipénème, le plus inquiétant serait la production de carbapénémases puisque l'activité des carbapénèmes peut être compromise par l'émergence de ces enzymes (**Pasteran et al., 2008; Sekhri et al., 2010**). Dans l'édition de janvier 2008 du document CLSI M100 (Clinical and Laboratory Standards

Institute, 2008), un article a inclu une alerte aux laboratoires pour contrôler et chercher toute production de carbapénémase chez les entérobactéries avec des CMI de 2 ou 4 µg/ml (Patel et al., 2009). Les méthodes phénotypiques, qui peuvent être combinées entre elles, ont l'avantage d'être faciles à réaliser. Elles permettent de mettre en évidence une résistance aux carbapénèmes sans en identifier précisément le mécanisme. La confirmation de la présence de ces gènes ne peut se faire actuellement que par l'utilisation d'outils moléculaires (**Cuzon et al., 2009**).

Le traitement des infections causées par les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes est difficile en effet, les choix thérapeutiques contre ce type de germes sont limités. Pour éviter ces épidémies, on doit procéder à des surveillances strictes de la résistance et de la consommation des antibiotiques à l'hôpital (**Wu et al., 2010**).

▪ Profil moléculaire

Les souches de notre étude présentent des résistances pour le cefotaxime et nous indique une dissémination de BLSE type CTX-M-15, ces résultat concordent avec celui de (Touati et al., 2008) qui rapportent une dissémination prédominante de BLSE CTX-M-15.

Nous avons également décrit dans notre étude un gène de résistance TEM- 136 chez *Enterobacter cloacae* récupéré d'une hémoculture positive d'un patient de 24 mois avec une leishmaniose viscérale, trois SHV- 28 à *Klebsiella pneumoniae* chez des patients atteints d'une maladie grave qui ; 10 mois atteints de leucémie , sept mois avec une pyélonéphrite aiguë et 24 mois avec détresse respiratoire , un SHV- 32 *Klebsiella pneumoniae* chez un patient de 9 mois avec détresse respiratoire et un SHV- 133 en *Klebsiella pneumoniae* chez un patient de 18 mois avec un lymphome .

En outre, notre étude est la première à noter la prévalence élevée chez les entérobactéries producteurs de BLSE chez des enfants septicémiques, y compris TEM-136, SHV-28 et SHV-32,. Nous montrons que TEM et SHV sont répandues parmi les entérobactéries isolats qui sont multi résistants. Nous démontrons également que la septicémie provoquée par ces entérobactéries est associée à des taux de mortalité très élevés (**Blomberg et al., 2005**)

Concernant le gène de résistance TEM-136, il a déjà été signalé dans *Klebsiella pneumoniae* en Italie, (**Bagattini et al., 2006**) , Mais c'est le premier gène de résistance TEM- 136 sur le continent africain en particulier dans Annaba - Algérie .

SHV-28 a été découvert en Tanzanie (**Ndugulile et al .86**), et a depuis été signalés dans de nombreuses régions du monde, telles : Italie, Royaume - arabes-unis, le Brésil, Oman, la Tunisie, la Chine, l'Inde, la Thaïlande et Copenhague (**Veras et al., 2011**) (**Shi et al., 2009**), (**Leavitt et al., 2009**), (**Poirel et al., 2011**), (**Perilli et al., 2011**), (**Nielsen et al., 2011**),

(**Alfaresi et al., 2011**), (**Jemima and Verghese, 2009**),(**Niumsup et al., 2008**) (**Rayamajhi et al., 2008**), mais n'a jamais été trouvé en Algérie c'est donc la première fois qu'on note le gène de résistance SHV-28 en Algérie en novembre 2011. (**Labid et al,2014**).

Concernant le type gène de SHV-32, il a été trouvé en Palestine, au Canada et l'Espagne, (**Hussein et al., 2009**), (**Melano et al., 2006**), (**Chaves et al., 2001**).

Notre étude est la première à rapporter le gène de résistance SHV- 32 BLSE en Algérie. En outre, notre étude est la première à noter la fréquence élevée chez les entérobactéries productrices de BLSE chez des enfants septicémiques, y compris TEM-136, SHV-28 et SHV-32,. Nous montrons que TEM et SHV sont répandues parmi les entérobactéries qui sont multi résistants.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram-négatif, particulièrement les Entérobactéries, représentent un problème majeur de santé publique (soussy 2007et al). La situation apparait particulièrement préoccupante en milieu hospitalier, et principalement en unité de soins intensifs où la septicémie est la première cause de mortalité en pédiatrie (Carcillo, 2005) et elle atteint plus de 50% dans les pays en voie de développement (Khan et al., 2012).

Les infections nosocomiales causées par ce type de bactéries ont conduit non seulement à une augmentation de la mortalité, de la morbidité et du coût de traitement, mais aussi continuent à mettre en danger la vie des patients surtout immunodéprimés. L'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques ainsi que la diffusion épidémique des souches résistantes a grandement contribué à la large diffusion de la résistance aux antibiotiques par acquisition de gènes de résistance a conditionné cette évolution (Messai et al., 2006).

Le principal mécanisme de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries est la production de β -lactamases (brazil 2011), une augmentation du nombre de BLSE produit par les entérobactéries a été observé ces deux dernières décennies et a été rapporté dans le monde entier (Hassan labadene2009),

Notre étude qui a porté sur des souches d'entérobactéries provenant de prélèvements pédiatriques d'hémoculture nous montre une diversité de souches où les *Klebsiella pneumoniae* sont les plus dominantes avec un taux de 79.16% et qui est significativement plus élevé que celui de l'étude faite en 2008 à Alger avec une prévalence de 19.9% du taux de *Klebsiella pneumoniae* BLSE (Messai et al., 2006), ou l'étude faite en octobre 2011 en Algérie avec une prévalence de 26.8% (Nedjai et al., 2012), et ceci pourrait être expliqué en une prévalence plus élevée de *Klebsiella pneumoniae* en milieu hospitalier dans les infections nosocomiales.

Concernant *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, et *Escherichia coli*, la fréquence de production de BLSE diffère d'un pays à un autre, (Bradford, 2001). Et d'après les études faites précédemment on a constaté que ces souches sont beaucoup plus fréquentes dans notre continent par rapport aux autres continents et ceci pourrait être expliqué par plusieurs facteurs principalement l'automédication et la prescription anarchique des antibiotiques à large spectre.

Nous avons trouvé que la fréquence globale de production de BLSE chez les entérobactéries dans cette étude est de 80.95% ce qui est un taux énorme comparant aux autres études faite en Europe (EARSS) la prévalence de BLSE pour, *Serratia marcescens*,

Enterobacter cloacae, *Klebsiella pneumoniae*, et *Escherichia coli* était respectivement 100% , 81,81% , 79,16% , et 66,66% .

La mortalité globale dans la présente étude est de (45,23%), au total , 19 cas de septicémie sont décédés , 10 (23,80%) de ces enfants étaient atteints de le lymphome et leucémie sont mort après un choc septique , 7 (16.66%)de ces patients atteint de leucémie lymphoblastique aiguë et détresse respiratoire sont morts après un sepsis sévère , 2 (4,71%) avec la méningite et la fièvre rhumatismale sont morts 7 jours l'épisode séptique.

Nous avons également décrit dans notre étude un gène de résistance TEM- 136 à *Enterobacter cloacae* récupéré d'une hémoculture positive d'un patient de 24 mois avec une leishmaniose viscérale , trois SHV- 28 à *Klebsiella pneumoniae* chez des patients atteints d'une maladie grave qui ; 10 mois atteints de leucémie , sept mois avec une pyélonéphrite aiguë et 24 mois avec détresse respiratoire , un SHV- 32 *Klebsiella pneumoniae* chez un patient de 9 mois avec détresse respiratoire et un SHV- 133 en *Klebsiella pneumoniae* chez un patient de 18 mois avec un lymphome .

En outre, notre étude est la première à noter la prévalence élevée chez les entérobactéries producteurs de BLSE chez des enfants septicémiques, y compris TEM-136, SHV-28 et SHV-32,. Nous montrons que TEM et SHV sont répandues parmi les entérobactéries isolats qui sont multi résistants. Nous démontrons également que la septicémie provoquée par ces entérobactéries est associée à des taux de mortalité très élevés (**Blomberg et al., 2005**)

Les patients atteints de sepsis dû à des souches productrices de BLSE ont un taux de mortalité nettement supérieur à ceux des souches non-productrices de BLSE. La prescription de plusieurs types de β -lactamases, en particulier C3G; l'automédication; un long séjour à l'hôpital; une prescription par des professionnels de la santé non qualifiés; la fin de l'initiation du traitement approprié; chimiothérapie inapproprié; la présence d'une veine centrale, une ventilation mécanique; et un temps plus long pour l'admission à la culture de sang ont été les principaux facteurs de risque importants pour l'infection à BLSE et significativement associée à une issue fatale. Il n'y avait pas de facteur de risque indépendant associé à un taux de mortalité plus élevé (**Tuon et al, 2011;** **Hsieh et al, 2010**). Le taux d'hospitalisation pour sepsis a presque doublé dans la dernière décennie (**Khan et al., 2012**).

Les carbapénèmes sont le médicament de choix pour de nombreuses infections causées par des bactéries à Gram négatif et demeure pleinement efficace contre les entérobactéries productrices de BLSE; ils sont souvent réservés pour traiter les infections les plus graves causés par de nombreux agents pathogènes multirésistants car ils sont plus en mesure d'échapper au moins une partie des mécanismes de résistance de β -lactamines qui affectent

les autres familles β -lactamines. Cependant, l'utilisation continue de ces antibiotiques a le risque d'effet de développer une résistance (soins Karen Bush critique) et créer une expression de différents types de BLSE et la sélection des enzymes mutantes complexes avec des phénotypes résistants aux inhibiteurs de ou des changements de porines a également conduit au développement de la résistance à l'imipénème et la céphamycines.

RESUME

Le but de cette étude est de déterminer le taux de mortalité de septicémie, l'émergence des entérobactéries multirésistantes, ainsi que leur supports génétiques chez des enfants septicémiques, pour cela 42 souches d'entérobactéries, ont été collectées de janvier 2010 à juillet 2011 dans l'hôpital Sainte-Thérèse de Annaba, Algérie.

L'identification des souches a été effectuée selon la galerie classique API 20 E et MALDI-TOF MS. l'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion d'antibiotique sur gélose et les concentrations minimales inhibitrices par la méthode diffusion en milieu solide. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés par les techniques de biologie moléculaire (PCR, séquençage).

Parmi ces isolats BLSE, 10 contenaient CTX-M-15, 13 avaient TEM-1, un isolat avait TEM-136, deux étaient positifs pour SHV-11, 8 ont SHV-12, 3 contenaient SHV-28, un isolat avait SHV-32, et un isolat avaient SHV-133. Un total de 45,2% des patients sont décédés.

La prévalence élevée des entérobactéries productrices de BLSE, avec l'observation de 19 cas mortels, est préoccupante, et la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif reste un problème de santé majeur dans les services de réanimation., par conséquent, nous croyons que la surveillance nationale de la résistance aux antibiotiques devrait être mise en œuvre de toute urgence en Algérie.

Mots clés: Sépticémie, Annaba, Enfants, BLSE, Enterobactéries, Sainte-Thérèse.

The aim of this study was to determine the mortality rate of sepsis, the emergence of *Enterobacteriaceae* ESBL producers, and their genetic supports in septicemia children,

42 strains of *Enterobacteriaceae* were collected from January 2010 to July 2011 in Sainte-Therese hospital Annaba, Algeria.

The identification of the strains was performed according to the classical gallery API 20 E and MALDI-TOF MS. susceptibility testing was performed by the method of dissemination of antibiotic agar and minimal inhibitory concentrations by the diffusion method in solid medium. The antibiotic resistance mechanisms have been identified using the techniques of molecular biology (PCR, sequencing).

Among these ESBL isolates, 10 contained CTX-M-15, 13 presented TEM-1, one isolate had TEM-136, two were positive for SHV-11, 8 have SHV-12, 3 contained SHV-28, one isolate had SHV-32, and one isolate had SHV-133. A total of 45.2% patients died.

The high prevalence of *Enterobacteriaceae* ESBL producers with the observation of 19 fatal cases, is worrying and antibiotic resistance among Gram negative bacteria remains a major health problem in intensive care units. Therefore we believe that the national surveillance of antibiotic resistance should be implemented urgently in Algeria.

Mots clés: Sépticémie, Annaba, Enfant, BLSE, Enterobactéries, Sainte-Thérèse.

Keywords: Septicemia, Annaba, children, ESBL, Enterobacteriaceae, Sainte-Thérèse.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد معدل الوفيات، البكتيريا المعوية المسؤولة و مادّتها الوراثية للتسمم الدّموي المصاب بالاطفال. لهذا 42 سلالة من البكتيريا المعوية تم جمعها من جانفي 2010 الى جويلية 2011 في مستشفى SAINTE THERESE عناية الجزائر.

ثم اجراء تحديد السلالات وفقا للغاري E 20API و MALDI-TOF-MS، التعرض للمضادات الحيوية ثم اجرائه عن طريقة الانتشار في وسط صلب

تحديد آليات المقاومة للمضادات الحيوية ثم تنفيذه عن طريق تقنيات البيولوجيا الجزيئية PCR, séquençage

من بين هذه السلالات BLSE 10 تتضمن CTX M-15 و 13 تحتوي على TEM-1 1 يحتوي على TEM-1 36 ، اثنين تتضمن SHV-11 ، 8 تحتوي على SHV-12 ، ثلاثة على SHV-28 1 كان يحتوي على SHV - 133 . المعدل الكلي للوفيات كان 45.23%

ارتفاع معدل انتشار BLSE المنتجة عن البكتيريا المعوية لتسمم الدّموي للأطفال مع ملاحظة 19 حالة فادحة تشكل مصدر قلق و المقاومة للمضادات الحيوية ل GRAM- M لا يزال يشكل مشكلة صحّية كبيرة في وحدات العناية المركزية لذلك -نحن نعتقد انه ينبغي تنفيذ المراقبة الوطنية لمقاومة المضادات الحيوية بشكل عاجل في الجزائر

كلمات البحث: التسمم الدّموي، عناية، الاطفال، البكتيريا المعوية SAINTE THERESE,

BLSE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott (2006). The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.).

Aboumarzouk, O.M. (2014). Extended spectrum beta-lactamase urinary tract infections. *Urol. Ann.* 6, 114–115.

Adrie, C., Azoulay, E., Francois, A., Clec'h, C., Darques, L., Schwebel, C., Nakache, D., Jamali, S., Goldgran-Toledano, D., Garrouste-Orgeas, M., et al. (2007). *Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal.* *Chest* 132, 1786–1793.

Ahoyo, A.T., Baba-Moussa, L., Anago, A.E., Avogbe, P., Missihoun, T.D., Loko, F., Prévost, G., Sanni, A., and Dramane, K. (2007). [Incidence of infections dues to *Escherichia coli* strains producing extended spectrum betalactamase, in the Zou/Collines Hospital Centre (CHDZ/C) in Benin]. *Médecine Mal. Infect.* 37, 746–752.

Alekshun, M.N., and Levy, S.B. (1999). The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* 7, 410–413.

Alfaresi, M.S., Elkoush, A.A., Alshehhi, H.M., and Abdulsalam, A.I. (2011). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United Arab Emirates. *Med. Princ. Pract. Int. J. Kuwait Univ. Health Sci. Cent.* 20, 177–180.

Allain P (2008). *Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines.* Les médicaments. 3ème édition. 500p

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289, 321–331.

Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., and Waley, S.G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 276, 269–270.

ANAGONOU SY, AKPONA S, JOSSE R, MASSOUGBODJE A et coll, 1993. Les isolements des bactéries dans les hémocultures au laboratoire de 83 bactériologie du C.N.H.U-Cotonou (1987-1990). *Médecine d’Afrique noire* : 40(10) : 614-9.

Anderson, J.W., Adediran, S.A., Charlier, P., Nguyen-Disteche, M., Frere, J.-M., Nicholas, R.A., and Pratt, R.F. (2003). On the substrate specificity of bacterial DD-peptidases: evidence from two series of peptidoglycan-mimetic peptides. *Biochem. J.* 373, 949–955.

Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29, 1303–1310.

Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guincestre, M.C., Guidet, B., and CUB-Réa Network (2003). Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 165–172.

Annane, D., Bellissant, E., and Cavillon, J.-M. (2005). Septic shock. *Lancet* 365, 63–78.

APPIT, 1996. Bactériémie, Sepsis et Choc septique, 15ème édition. E. PILLY, Montmorency: 2M2 : 19-25.

Ares, M.Á., Alcántar-Curiel, M.D., Jiménez-Galicia, C., Rios-Sarabia, N., Pacheco, S., and De la Cruz, M.Á. (2014). Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacilli Isolated from Pediatric Patients with Nosocomial Bloodstream Infections in a Mexican Tertiary Care Hospital. *Chemotherapy* 59, 361–368.

Arlet G, G. (2006). RICAI (PARIS).

Asma Labid, Djamilia Gacemi-Kirane, Mohammed Timinouni, Kamel Amoura and Jean-Marc Rolain (2014). High prevalence of ESBL-producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *African Journal of Microbiology Research* Vol.8(9), pp. 947-954 .

Avril et al (2000). Bactériologie clinique. 3ème édition. Ellipses édition marketing S.A. Paris. p 171-229.

Babic, M., Hujer, A.M., and Bonomo, R.A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 9, 142–156.

Bagattini, M., Crivaro, V., Di Popolo, A., Gentile, F., Scarcella, A., Triassi, M., Villari, P., and Zarrilli, R. (2006). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 979–982.

Bajčetić, M., Spasić, S., and Spasojević, I. (2014). Redox Therapy in Neonatal Sepsis: Reasons, Targets, Strategy, and Agents. *Shock* Augusta Ga.

BARRAUK et al, (2004). Causative organisms of infective endocarditis according to host status *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 302-308.

BAUDAT V. d'Arnex-sur-Orbe, 2002. “Hémocultures positives à l'Hôpital Cantonal de Fribourg, 1997-1998 : signification clinique, microbiologie, épidémiologie, traitement et pronostic”. Lausanne. .10248: 06-09.

Bauer, M., and Reinhart, K. (2010). Molecular diagnostics of sepsis--where are we today? *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 300, 411–413.

Bauernfeind, A., and Hörl, G. (1987). Novel R-factor borne beta-lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infection* 15, 257–259.

Becerra, M.R., Tantaleán, J.A., Suárez, V.J., Alvarado, M.C., Candela, J.L., and Urcia, F.C. (2010). Epidemiologic surveillance of nosocomial infections in a Pediatric Intensive Care Unit of a developing country. *BMC Pediatr.* 10, 66.

Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S347–S357.

Berche (2003). Bactériologie systématique D.C.E.M. 1. Faculté de médecine Necker-Enfant malade.

Berkowitz, D.M., and Martin, G.S. (2007). Sepsis and sex: can we look beyond our hormones? *Chest* 132, 1725–1727.

Bernard, G.R., Wheeler, A.P., Russell, J.A., Schein, R., Summer, W.R., Steinberg, K.P., Fulkerson, W.J., Wright, P.E., Christman, B.W., Dupont, W.D., et al. (1997). The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 336, 912–918.

Blomberg, B., Jureen, R., Manji, K.P., Tamim, B.S., Mwakagile, D.S.M., Urassa, W.K., Fataki, M., Msangi, V., Tellevik, M.G., Maselle, S.Y., et al. (2005). High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *J. Clin. Microbiol.* 43, 745–749.

Bonacorsi et al (2001). Facteurs de virulence associés à *E. coli* responsable de méningite néonatale. Elsevier SAS.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644–1655.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1–14.

Bornet, C., Davin-Regli, A., Bosi, C., Pages, J.M., and Bollet, C. (2000). Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1048–1052.

Bossi, P., Grimaldi, D., Caille, V., and Vieillard-Baron, A. (2004). [Diagnosis of sepsis, severe sepsis and septic shock]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 33, 262–264; discussion 269.

Bouchillon, S.K., Johnson, B.M., Hoban, D.J., Johnson, J.L., Dowzicky, M.J., Wu, D.H., Visalli, M.A., and Bradford, P.A. (2004). Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 119–124.

Bourjilat, F., Bouchrif, B., Dersi, N., Claude, J.D.P.G., Amarouch, H., and Timinouni, M. (2011). Emergence of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in community-acquired urinary infections in Casablanca, Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5, 850–855.

Bradford, P.A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 933–951.

Branco, R.G., Garcia, P.C.R., Garcia, J.P.T., Piva, J.P., and Ross-Russell, R. (2005). Interactions of sepsis, organ dysfunction, and outcome of critically ill children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *172*, 1606; author reply 1606–1607.

Brown, D.F., Andrews, J., King, A., and MacGowan, A.P. (2000). Detection of extended-spectrum beta-lactamases with Etest and double-disc potentiation methods. *J. Antimicrob. Chemother.* *46*, 327–328.

Brun-Buisson, C. (2000). The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* *26 Suppl 1*, S64–S74.

Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Black, R.E., and WHO Child Health Epidemiology Reference Group (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* *365*, 1147–1152.

Bryskier, A. (1984). [Classification of beta-lactams]. *Pathol. Biol. (Paris)* *32*, 658–667.

Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 969–976.

Bush, K., and Sykes, R.B. (1986). Methodology for the study of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *30*, 6–10.

Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 1211–1233.

Caille, V., Bossi, P., Grimaldi, D., and Vieillard-Baro, A. (2004). [Physiopathology of severe sepsis]. *Presse Médicale Paris Fr.* *1983 33*, 256–261; discussion 269.

Cambray, G., Guerout, A.-M., and Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu. Rev. Genet.* *44*, 141–166.

Canoui, E., Tankovic, J., Bige, N., Alves, M., and Offenstadt, G. (2014). Which proportion of extended-spectrum beta-lactamase producing strains could be treated by non-carbapenem beta-lactams? *Med. Mal. Infect.*

Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., and Coque, T.M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *14 Suppl 1*, 144–153.

Carcillo, J.A. (2005). Reducing the global burden of sepsis in infants and children: a clinical practice research agenda. *Pediatr. Crit. Care Med. J. Soc. Crit. Care Med. World Fed. Pediatr. Intensive Crit. Care Soc.* *6*, S157–S164.

Carmeli, Y., Akova, M., Cornaglia, G., Daikos, G.L., Garau, J., Harbarth, S., Rossolini, G.M., Souli, M., and Giamarellou, H. (2010). Controlling the spread of carbapenemase-

producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 102–111.

Carrigan, S.D., Scott, G., and Tabrizian, M. (2004). Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clin. Chem.* 50, 1301–1314.

De Champs, C., Poirel, L., Bonnet, R., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., and Nordmann, P. (2002). Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3031–3034.

Chandramohan, L., and Revell, P.A. (2012). Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in a Pediatric Patient Population. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4765–4770.

Chaves, J., Ladona, M.G., Segura, C., Coira, A., Reig, R., and Ampurdanés, C. (2001). SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2856–2861.

CHIRON JP, DENIS F, SAMB A, PRINCE-DAVID M, 1997. Bilan de 717 souches de salmonella isolées en milieu hospitalier dakarais. *Bull Soc Méd. Afr Nre Glue Frse*; 22: 65-71.

CONTREPOIS A. 1995. Naissance de l'hémoculture. *Rev Prat*; 45 : 942-7.

Coque, T.M., Baquero, F., and Canton, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 13.

Cormican, M.G., Marshall, S.A., and Jones, R.N. (1996). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1880–1884.

Coutinho, F.H., Silveira, C.B., Pinto, L.H., Salloto, G.R.B., Cardoso, A.M., Martins, O.B., Vieira, R.P., and Clementino, M.M. (2014). Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. *Microb. Ecol.*

D'Andrea, M.M., Arena, F., Pallecchi, L., and Rossolini, G.M. (2013). CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 303, 305–317.

Delihis, N., and Forst, S. (2001). MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J. Mol. Biol.* 313, 1–12.

Denis et al (2007). Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson. p 316-318.

Dombrovskiy, V.Y., Martin, A.A., Sunderram, J., and Paz, H.L. (2007). Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit. Care Med.* 35, 1244–1250.

EARS-Net (2011). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

Eckert, C., Gautier, V., Saladin-Allard, M., Hidri, N., Verdet, C., Ould-Hocine, Z., Barnaud, G., Delisle, F., Rossier, A., Lambert, T., et al. (2004). Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 1249–1255.

Esper, A.M., Moss, M., Lewis, C.A., Nisbet, R., Mannino, D.M., and Martin, G.S. (2006). The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit. Care Med.* *34*, 2576–2582.

Euzéby (2003). Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. SERRATIA.

Farah Abid , Boutefnouchet Nafissa , Dekhil Mazouz , Bouzerna Nouredine 2007. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTRICES DE BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI (BLSE) ISOLEES DANS LES HOPITAUX DE LA VILLE DE ANNABA, ALGERIE

Fauchère (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses Edition Marketing. Paris.
p 250-260.

FAUCHERE JL, 1997. Techniques de bactériologie clinique. Edition marketing S.A: 77 - 79.

Ferres, H., and Nunn, B. (1983). Penicillin metabolites and platelet function. *Lancet* *2*, 226–227.

Finfer, S., Bellomo, R., Lipman, J., French, C., Dobb, G., and Myburgh, J. (2004). Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med.* *30*, 589–596.

Fouquet, M., Morange, V., and Bruyère, F. (2012). *[Five years follow-up of infections with extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae]. Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* *22*, 17–21.

Fraser et al (2010). Enterobacter Infections. eMedicine Specialties. Infectious Diseases. Bacterial Infections. Contributor Information and Disclosures.

Gallardo, F., Ruiz, J., Soto, S.M., Jimenez de Anta, M.T., and Vila, J. (2003). [Different antibiotic resistance mechanisms associated with integrons in clinical isolates of *Salmonella typhimurium*]. *Rev. Esp. Quimioter. Publ. Of. Soc. Esp. Quimioter.* *16*, 398–402.

Geser, N., Stephan, R., and Hächler, H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet. Res.* *8*, 21.

Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., and Sekawi, Z. (2014). Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr. Issues Mol. Biol.* *17*, 11–22.

GORO D, 2002. Etude de la prévalence des infections nosocomiales d'origine bactérienne dans le service de néphrologie et dans l'unité d'hématologie à l'Hôpital du point G. Thèse Pharm. Bamako, N° (02-P-50).

GOULON M, 1985. Etat de choc et réanimation cardio-vasculaire. Abrégés de réanimation Médicale, Masson, Paris, : 194-204. 81.

Guillemot, D., Courvalin, P., and French Working Party to Promote Research to Control Bacterial Resistance (2001). Better control of antibiotic resistance. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 33, 542–547.

Gupta, V. (2007). An update on newer beta-lactamases. Indian J. Med. Res. 126, 417–427.

Gupta, V., Kumarasamy, K., Gulati, N., Garg, R., Krishnan, P., and Chander, J. (2012). AmpC β -lactamases in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from India. Indian J. Med. Res. 136, 237–241.

Hammoud, M.S., Al-Taiar, A., Thalib, L., Al-Sweih, N., Pathan, S., and Isaacs, D. (2012). Incidence, aetiology and resistance of late-onset neonatal sepsis: a five-year prospective study. J. Paediatr. Child Health 48, 604–609.

Hancock, R.E. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. Trends Microbiol. 5, 37–42.

Hernández, E., Araque, M., Millán, Y., Millán, B., and Vielma, S. (2014). [Prevalence of beta-lactamase CTX-M-15 in phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients in the community of Merida, Venezuela]. Investig. Clínica 55, 32–43.

Ho, P.L., Tsang, D.N., Que, T.L., Ho, M., and Yuen, K.Y. (2000). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 108, 237–240.

Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., and Philippon, A. (2002). Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3045–3049.

Hussein, A.I.A., Ahmed, A.M., Sato, M., and Shimamoto, T. (2009). Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Palestinian hospitals. Microbiol. Immunol. 53, 595–602.

Ingram, L.C., Richmond, M.H., and Sykes, R.B. (1973). Molecular Characterization of the R Factors Implicated in the Carbenicillin Resistance of a Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burns. Antimicrob. Agents Chemother. 3, 279–288.

Inwald, D.P., Tasker, R.C., Peters, M.J., Nadel, S., and Paediatric Intensive Care Society Study Group (PICS-SG) (2009). Emergency management of children with severe sepsis in the United Kingdom: the results of the Paediatric Intensive Care Society sepsis audit. Arch. Dis. Child. 94, 348–353.

Jacoby, G.A. (2009). AmpC β -Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22, 161–182.

Jacoby, G.A., and Han, P. (1996). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 34, 908–911.

Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867–878.

Jean-Louis POURRIAT (2005). Principe de réanimation chirurgicale Claude Martin 2^{ème} édition 2005.

Jemima, S.A., and Verghese, S. (2009). SHV-28, an extended-spectrum beta-lactamase produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* in south India. *Indian J. Med. Microbiol.* 27, 51–54.

Joly B. et Reynaud A (2007). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Edition Techniques et Documentation.

Joris, B., De Meester, F., Galleni, M., Masson, S., Dusart, J., Frere, J.M., Van Beeumen, J., Bush, K., and Sykes, R. (1986). Properties of a class C beta-lactamase from *Serratia marcescens*. *Biochem. J.* 239, 581–586.

Khan, M.R., Maheshwari, P.K., Masood, K., Qamar, F.N., and Haque, A.-U. (2012). Epidemiology and outcome of sepsis in a tertiary care PICU of Pakistan. *Indian J. Pediatr.* 79, 1454–1458.

Khilnani, P., Singhi, S., Lodha, R., Santhanam, I., Sachdev, A., Chugh, K., Jaishree, M., Ranjit, S., Ramachandran, B., Ali, U., et al. (2010). Pediatric Sepsis Guidelines: Summary for resource-limited countries. *Indian J. Crit. Care Med. Peer-Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* 14, 41–52.

Lahlaoui, H., Anis, B.H.K., Mohamed, K., and Mohamed, B.M. (2012). Emergence of SHV-12 extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Tunisia. *Microb. Pathog.* 53, 64–65.

Lambert, P.A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1471–1485.

Laurence Drieux (2012). Sucées plasmidique : transmission inter espèces d'un plasmide portant un gène métallo béta-lacamase.

Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Colodner, R., Ofek, I., Carmeli, Y., and Navon-Venezia, S. (2009). Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 47, 969–974.

Leclerc, F., Leteurtre, S., Duhamel, A., Grandbastien, B., Proulx, F., Martinot, A., Gauvin, F., Hubert, P., and Lacroix, J. (2005). Cumulative influence of organ dysfunctions and septic state on mortality of critically ill children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 348–353.

Leclercq M. (2006). *Enterobacter sakazakii*. Agence française de sécurité sanitaire des aliments AFSSA.

Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.-L., Ramsay, G., et al. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* *31*, 1250–1256.

Li, X.Z., Ma, D., Livermore, D.M., and Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *38*, 1742–1752.

Linscott, A.J., and Brown, W.J. (2005). Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 1081–1085.

Livermore, D.M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* *8*, 557–584.

Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., et al. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* *59*, 165–174.

Llewelyn, M., Cohen, J., and International Sepsis Forum (2001). Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med.* *27 Suppl 1*, S10–S32.

Lukacs, S.L., and Schrag, S.J. (2012). Clinical sepsis in neonates and young infants, United States, 1988-2006. *J. Pediatr.* *160*, 960–965.e1.

Luregn J, et al (2012). Pourquoi les enfants contractent une septicémie La Swiss Pediatric Sepsis Study, étude de cohorte du PIGS sur l'épidémiologie et les causes génétiques et immunologiques de la septicémie du nouveau-né et de l'enfant.

Luzzaro, F., Ortisi, G., Larosa, M., Drago, M., Brigante, G., and Gesu, G. (2011). Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *69*, 363–369.

Marshall, J.C. (2000). SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care? *Shock Augusta Ga* *14*, 586–589.

Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M. (2003a). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1546–1554.

Martinez, J.L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* *276*, 2521–2530.

Martinez, J.L., and Baquero, F. (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 1771–1777.

Massova, I., and Mobashery, S. (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 1–17.

Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frere, J.M. (1998). Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.* *330*, 581–598.

- Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., and Mine, Y. (1988).** Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* *32*, 1243–1246.
- Melano, R.G., Davidson, R.J., Musgrave, H.L., and Forward, K.R. (2006).** Cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Nova Scotia, Canada. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *56*, 197–205.
- Menif, K., Khaldi, A., Bouziri, A., Kechaou, W., Belhadj, S., Hamdi, A., Kazdaghi, K., and Benjaballah, N. (2009).** [Mortality rates in pediatric septic shock secondary to community-acquired infection: about 70 cases]. *Médecine Mal. Infect.* *39*, 896–900.
- Messai, Y., Benhassine, T., Naim, M., Paul, G., and Bakour, R. (2006).** Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Rev. Esp. Quimioter. Publ. Of. Soc. Esp. Quimioter.* *19*, 144–151.
- Meyer A., et al (2004).** Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. 200 p.
- Michel VAUBOURDOLLE (2007).** Infectiologie 3^{ème} édition 700p.
- Mulvey, M.R., Bryce, E., Boyd, D., Ofner-Agostini, M., Christianson, S., Simor, A.E., Paton, S., and Canadian Hospital Epidemiology Committee, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada (2004).** Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 1204–1214.
- Murdoch, D.R. (2009).** Microbiological patterns in sepsis: what happened in the last 20 years? *Int. J. Antimicrob. Agents* *34 Suppl 4*, S5–S8.
- Naas (2003).** Phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche *Acinetobacter baumannii* productrice de la β -lactamase VEB-1. Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène (P. Nordmann), CHU de Bicêtre. *Journal of Clinical Microbiology*; *41*: 3542.
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2001).** Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* *183*, 235–249.
- Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., and Timinouni, M. (2012).** Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine Mal. Infect.* *42*, 20–29.
- Nicolas, M.H., Honore, N., Jarlier, V., Philippon, A., and Cole, S.T. (1987).** Molecular genetic analysis of cephalosporinase production and its role in beta-lactam resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *31*, 295–299.
- Nielsen, J.B., Skov, M.N., Jørgensen, R.L., Heltberg, O., Hansen, D.S., and Schønning, K. (2011).** Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* *30*, 773–778.

Niumsup, P.R., Tansawai, U., Boonkerd, N., Polwichai, P., and Dejsirilert, S. (2008). Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Thai hospitals. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* *14*, 404–408.

OMS (2010). Organisation Mondiale de la Santé.

Osterbur, K., Mann, F.A., Kuroki, K., and Declue, A. (2014). Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Humans and Animals. *J. Vet. Intern. Med. Am. Coll. Vet. Intern. Med.*

Padkin, A., Goldfrad, C., Brady, A.R., Young, D., Black, N., and Rowan, K. (2003). Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit. Care Med.* *31*, 2332–2338.

Pai, H., Lyu, S., Lee, J.H., Kim, J., Kwon, Y., Kim, J.W., and Choe, K.W. (1999). Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 1758–1763.

Parrillo, J.E., Parker, M.M., Natanson, C., Suffredini, A.F., Danner, R.L., Cunnion, R.E., and Ognibene, F.P. (1990). Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann. Intern. Med.* *113*, 227–242.

Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 657–686.

Patrice Courvalin 2008;Antibiotics 3^{ème} Edition,800p.

Peleg, A.Y., and Hooper, D.C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* *362*, 1804–1813.

Perilli, M., Segatore, B., Mugnaioli, C., Celenza, G., Rossolini, G.M., Stefani, S., Luzzaro, F., Pini, B., and Amicosante, G. (2011). Persistence of TEM-52/TEM-92 and SHV-12 extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Italy. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* *17*, 521–524.

PHILIPPON A, PAUL G, NEVOT P, 1983. L'hémoculture. *Rev Prat* ; *33* : 1929- 1938.

Pitout, J.D.D., Reisbig, M.D., Venter, E.C., Church, D.L., and Hanson, N.D. (2003). Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 3933–3935.

Pletz, M.W., Wellinghausen, N., and Welte, T. (2011). Will polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostics improve outcome in septic patients? A clinical view. *Intensive Care Med.* *37*, 1069–1076.

Poirel, L., Kämpfer, P., and Nordmann, P. (2002). Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 4038–4040.

Poirel, L., Decousser, J.-W., and Nordmann, P. (2003). Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 2938–2945.

Poirel, L., Lartigue, M.-F., Decousser, J.-W., and Nordmann, P. (2005). ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 447–450.

Poirel, L., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2011). NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 304–306.

Poole, K. (1994). Bacterial multidrug resistance--emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* *34*, 453–456.

Póvoa, P. (2008). Serum markers in community-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *21*, 157–162.

Pradhan, R., Shrestha, U., Gautam, S.C., Thorson, S., Shrestha, K., Yadav, B.K., Kelly, D.F., Adhikari, N., Pollard, A.J., and Murdoch, D.R. (2012). Bloodstream infection among children presenting to a general hospital outpatient clinic in urban Nepal. *PloS One* *7*, e47531.

Prescott et al (2003). MICROBIOLOGIE 2^{ème} édition 800p.

Rahal et al (2010). STANDARISATION DE L'ANTIBIOGRAMME A L'ECHELLE NATIONALE EN MEDECINE HUMAINE ET VETERINAIRE.

Rawat, D., and Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J. Glob. Infect. Dis.* *2*, 263–274.

Rayamajhi, N., Kang, S.G., Lee, D.Y., Kang, M.L., Lee, S.I., Park, K.Y., Lee, H.S., and Yoo, H.S. (2008). Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type beta-lactamases from cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae isolated from swine. *Int. J. Food Microbiol.* *124*, 183–187.

Réjiba, S., Mercuri, P.S., Power, P., and Kechrid, A. (2011). Emergence and dominance of CTX-M-15 extended spectrum beta-lactamase among *Escherichia coli* isolates from children. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* *17*, 135–140.

Rodríguez, I., Thomas, K., Van Essen, A., Schink, A.-K., Day, M., Chattaway, M., Wu, G., Mevius, D., Helmuth, R., Guerra, B., et al. (2014). Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int. J. Antimicrob. Agents.*

Rodríguez, M.M., Power, P., Radice, M., Vay, C., Famiglietti, A., Galleni, M., Ayala, J.A., and Gutkind, G. (2004). Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 4895–4897.

Sáez-Llorens, X., Vargas, S., Guerra, F., and Coronado, L. (1995). Application of new sepsis definitions to evaluate outcome of pediatric patients with severe systemic infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *14*, 557–561.

SAMAKE M, 2004. Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyse médicale de l'Hôpital Gabriel TOURE : aspect méthodologique. Thèse Pharm. Bamako N° (04-P-6).

Sanders, C.C., Barry, A.L., Washington, J.A., Shubert, C., Moland, E.S., Traczewski, M.M., Knapp, C., and Mulder, R. (1996). Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2997–3001.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnol. Read. Mass* 24, 104–108.

Saravanan, R., and Raveendaran, V. (2013). Antimicrobial resistance pattern in a tertiary care hospital: An observational study. *J. Basic Clin. Pharm.* 4, 56–63.

Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J.M., and Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 49, 543–551.

Sennati, S., Santella, G., Di Conza, J., Pallecchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., Rossolini, G.M., Radice, M., and Gutkind, G. (2012). Changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6003–6005.

Shi, W., Zhou, J., and Qin, J. (2009). Transconjugation and genotyping of the plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Chin. Med. J. (Engl.)* 122, 1092–1096.

SNYDER JW et al (2001). Clinical comparison of non vented aerobic BacT/Alert blood culture bottle and Standard Aerobic Bottle for detection of microorganisms in Blood J. *clin. Microb.* 2000 38 , 10 , 3864-3866.

Spencer, R.C., Wheat, P.F., Winstanley, T.G., Cox, D.M., and Plested, S.J. (1987). Novel beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 20, 919–921.

Steven et al (2013). *The Principles of Clinical Cytogenetics Third Edition.* 590 p.

Thomson, K.S. (1995). Improved detection extended spectrum β -lactamase from disc diffusion susceptibility test.

Thomson, K.S., and Sanders, C.C. (1992). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1877–1882.

Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J., and De Champs, C. (2008). First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 287–290.

VANDEPITTE J, VERHAEGEN J, et Coll, 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organisation. Geneva. Edition: 20-120.

Vanhove, M., Houba, S., b1motte-Brasseur, J., and Frere, J.M. (1995). Probing the determinants of protein stability: comparison of class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 308, 859–864.

Vaux, S., Carbonne, A., Thiolet, J.M., Jarlier, V., Coignard, B., and RAISIN and Expert Laboratories Groups (2011). Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 16.

Veras, D.L., Alves, L.C., Brayner, F.A., Guedes, D.R.D., Maciel, M.A.V., Rocha, C.R.C., and de Souza Lopes, A.C. (2011). Prevalence of the bla (SHV) gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. *Curr. Microbiol.* 62, 1610–1616.

Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C.C., and Goossens, H. (1997). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2191–2197.

Vervoort, J., Baraniak, A., Gazin, M., Sabirova, J., Lammens, C., Kazma, M., Grabowska, A., Izdebski, R., Carmeli, Y., Kumar-Singh, S., et al. (2012). Characterization of two new CTX-M-25-group extended-spectrum β -lactamase variants identified in *Escherichia coli* isolates from Israel. *PloS One* 7, e46329.

Vincent, J.L. (1997). Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit. Care Med.* 25, 372–374.

Vincent, J.-L., Sakr, Y., Sprung, C.L., Ranieri, V.M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J.-R., Payen, D., et al. (2006). Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* 34, 344–353.

Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., et al. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 302, 2323–2329.

Walsh, T.R. (2006). Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 476–482.

Wang, Y., Song, C., Duan, G., Zhu, J., Yang, H., Xi, Y., and Fan, Q. (2013). Transposition of ISEcp1 modulates blaCTX-M-55-mediated *Shigella flexneri* resistance to cefalothin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 507–512.

Weber, D.A., Sanders, C.C., Bakken, J.S., and Quinn, J.P. (1990). A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 162, 460–465.

Weiler, S., and Corti, N. (2014). [Antibiotic therapy: impact and resistance]. *Med. Klin. Intensivmed. Notfallmedizin* 109, 167–174.

Wheeler, A.P., and Bernard, G.R. (1999). Treating patients with severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 340, 207–214.

Winters, B.D., Eberlein, M., Leung, J., Needham, D.M., Pronovost, P.J., and Sevransky, J.E. (2010). Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit. Care Med.* 38, 1276–1283.

Wu, V.-C., Huang, J.-W., Hsueh, P.-R., Yang, Y.-F., Tsai, H.-B., Kan, W.-C., Chang, H.-W., Wu, K.-D., and SARS Research Group of National Taiwan University College of Medicine and National Taiwan University Hospital (2005). Renal hypouricemia is an ominous sign in patients with severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 45, 88–95.

Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., and Arakawa, Y. (2000). A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 184, 53–56.

Yan, J.J., Wu, S.M., Tsai, S.H., Wu, J.J., and Su, I.J. (2000). Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1438–1442.

Yvon Michel-Briand (2009). Une histoire de la résistance aux antibiotiques A propos de six bactéries. Edition l'Harmattan 350 p.

Yvon Michel-Briand (2012). ASPECTS DE LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES Edition l'Harmattan. 400 p.

Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 361–385.

Zerr, D.M., Qin, X., Oron, A.P., Adler, A.L., Wolter, D.J., Berry, J.E., Hoffman, L., and Weissman, S.J. (2014). Pediatric Infection and Intestinal Carriage due to Extended Spectrum Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*

Zhuo, C., Li, X., Zong, Z., and Zhong, N.-S. (2013). Epidemic plasmid carrying bla(CTX-M-15) in *Klebsiella pneumoniae* in China. *PloS One* 8, e52222.

Full Length Research Paper

High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria

Asma Labid^{1,2}, Djamila Gacemi-Kirane², Mohammed Timinouni³, Kamel Amoura⁴ and Jean-Marc Rolain^{1*}

¹Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE CNRS-IRD, UMR 7278, IHU Méditerranée infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

²Faculté des Sciences, département de biochimie, université Badji Mokhtar Annaba, BP 12 2300 Annaba, Algeria.

³Institut Pasteur, laboratoire de Bactériologie Moléculaire, Casablanca, 20360, Maroc.

⁴Laboratoire Central de Microbiologie, CHU Annaba, Algeria.

Accepted 5 February, 2014

The aim of this study was to determine the prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers and to perform molecular typing of ESBL-encoding genes in Enterobacteriaceae from clinical isolates recovered from blood samples of children in Annaba, Algeria. A total of 42 clinical isolates were collected from March 2010 to July 2011 from the pediatric hospital of Annaba. The strains were identified by phenotypic tests and the ESBL-encoding genes was accomplished by PCR amplification and sequencing. Among these isolates, 10 ESBL isolates had CTX-M-15, 13 had TEM-1, one isolate had TEM-136, 2 were positive for SHV-11, 8 had SHV-12, 3 had SHV-28, 1 isolate contained SHV-32, and 1 isolate had SHV-133. A total of 45.2% of the patients died. The high prevalence of ESBL producers among Enterobacteriaceae, along with the observation of 19 fatal cases, is worrisome; therefore, we believe that national surveillance of antibiotic resistance should be urgently implemented in Algeria.

Key words: Antibiotic resistance, Enterobacteriaceae, Algeria, septicemia.

INTRODUCTION

Antibiotic resistance has become a global health problem during the past two decades (Rolain et al., 2012). Combination of issues has created conditions that lead to the dissemination and selection for resistant bacteria, such as population density, uncontrolled use of antibiotics, lack of clean water supply, and lack of proper treatment for sewage and industrial effluents (Bush et al., 2011).

Most of the extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) detected in Enterobacteriaceae were of the TEM and SHV types until 1989, when a new type of ESBL of

the CTX-M family with a high level of resistance to cefotaxime was discovered in *Escherichia coli* in Germany (Anastay et al., 2012). This ESBL type had previously been described in other species of Enterobacteriaceae in 1991 and, specifically, in *Salmonella enterica* in France, Argentina, Senegal and Algeria; therefore, antibiotic resistance associated with the acquisition of ESBLs, CTX-M-15 in particular, is emerging at a spectacular rate (Edelstein et al., 2003; Weill et al., 2004; Touati et al., 2008); and is considered one of the most frequently

occurring ESBLs in the world (Anastay et al., 2012).

The economic and human cost caused by ESBLs is increasing at an alarming rate. For instance, in 2007, antibiotic-resistant infections were responsible for 2,500 deaths in Europe with a loss of 2.5 million Euros and supplementary hospital costs that exceeded 1.5 billion Euros (Bush et al., 2011). The empirical treatment has a high incidence, particularly due to the widespread prescription of third generation cephalosporins, (C3Gs), which result in high levels of ESBL dissemination. The occurrence of ESBLs is often overlooked due to inadequate detection techniques, which lead to an underestimation of their prevalence at both the local and national levels (De Kraker et al., 2011).

Since 2006, few reports have been published on the current situation in Algeria. Little information is available on pediatric infections caused by extended spectrum β -lactamases, particularly from children whose infections lead to sepsis- a major public health crisis (Nedjai et al., 2012; Oteo et al., 2012). Several studies have shown that sepsis is a major cause of mortality in hospitalized patients, and about \$17 billion is spent annually on its treatment (Allareddy et al., 2012).

According to the World Health Organization (WHO year), sepsis is the fourth leading cause of death in children younger than four years of age (Bryce et al., 2005). In developing countries, the rate of sepsis in children in pediatric intensive care units (PICUs) is higher than 50% (Khan et al., 2012).

Information regarding the molecular epidemiology and the current knowledge about the prevalence of ESBLs in Enterobacteriaceae isolated from blood culture samples from children in Algeria is cited in this paper. This study is the first in Algeria that addresses pediatric sepsis mortality caused by Gram-negative bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

A total of 42 non-replicated Enterobacteriaceae isolates were collected from pediatric blood culture samples with citrate broth at the Laboratory of Microbiology, the Pediatric Hospital of Annaba (Algeria) from March 2010 to July 2011. The identification of Enterobacteriaceae species was performed using the API 20 E system (Biomérieux, Marcy l'étoile, France) and confirmed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Seng et al., 2009). The number of patients with sepsis caused by bacterial isolates of different ESBL types and the clinical outcomes for these patients are shown in Table 1.

Antimicrobial susceptibilities

Antimicrobial susceptibility was determined for the following 25 antimicrobial agents by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar according to the French Society for Microbiology guidelines (Soussy et al., 2012): piperacillin (75 μ g), ticarcillin (75 μ g), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 μ g), piperacillin/tazobactam (75/10 μ g), cefazolin (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), cefuroxime (30 μ g), cefotaxime

(30 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g), cefepime (30 μ g), Aztreonam (30 μ g), imipenem (10 μ g), amikacin (30 μ g), gentamicin (15 μ g) nalidixic acid, (30 μ g), ofloxacin (5 μ g), pefloxacin (5 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), chloramphenicol (30 μ g), tetracycline (30 μ g), colistin (50 μ g), nitrofurantoin (300 μ g), trimethoprim/ sulfamethoxazole (1.25/23.75 μ g) and fosfomycin (50 μ g).

Phenotypic detection of ESBL

Isolates showing an inhibition zone size of \leq 18 mm with ceftazidime or 22 mm with ceftazidime were identified as potential ESBL producers, as recommended by the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society (CA-SFM) recommendations and were selected for the sequencing of the genes encoding CTX-M, TEM and SHV. Screening of the 42 strains to test for ESBL secretion in Enterobacteriaceae strains was performed by double disk synergy test (DDST) as described by Jarlier et al. (1988) using a central amoxicillin + clavulanic acid disk 20 mm away from cefotaxime, ceftazidime or Aztreonam disks. The presence of ESBLs was indicated by a champagne cork aspect.

Detection of resistance genes

Detection of the ESBL genes encoding CTX-M, TEM, and SHV was performed with total DNA; briefly, a fresh bacterial colony was suspended in 200 μ l of sterile deionized water and stored at -20°C for PCR assays. A commercial Master Mix was used (Quantitect Probe PCR Master mix, Qiagen), and the primers used are given in Table 2. Amplification was carried out on a DNA thermal cycler (Multigene Labnet International, Inc.) as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min; 35 cycles of 94°C for one min, 55°C for 50 s, 72°C for 1 min; and a final elongation step at 72°C for 7 min (Edelstein et al., 2003; Kruger et al., 2004; Yagi et al., 2000).

The amplicons were visualized after electrophoresis at 150 V for 30 min on a 1% agarose gel containing ethidium bromide and visualized with an E-BOX VILBER, printed by a Sony digital graphic printer UP897, and sequenced using the Big Dye R Terminator V3.1 Cycle sequencing kit. The sequences were synthesized with an ABI 3100 automated Sequencer (Applied, Biosystems, Foster City, CA) and then analyzed with Codon code aligner software; comparisons with known sequences were made using the BLAST software provided by the National Center of Biotechnology Information (NCBI).

RESULTS

A septicemia was documented in 42 inpatients during the study period. The patients had a median age of 2 years and 10 months (range 2 months to 14 years); 32 (76.19%) were male. Various conditions were diagnosed among patients, 26.19% had leukemia; 14.28% had lymphoma; 11.90% had respiratory distress and cystitis; 9.52% had leishmaniasis Kala Azar; 7.14% had acute pyelonephritis; 4.76% had anemia, chronic obstructive-bronchitis and ND; and 2.38% had meningitis and rheumatic fever. A total of 45.23% of cases were fatal.

Among the 42 Enterobacteriaceae blood culture strains collected, 34 had ESBL phenotype; therefore, 80.95% of the isolates were defined as extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producers according to DDST method. The isolates tested and the rates of ESBLs producers were

Table 1. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, and *Serratia marcescens* from blood samples

code	Patient profile				Strain	Antibiotic phenotype	CTX-M	TEM	SHV	Outcome
	Sex	Age (months)	Reasons for hospitalization	Type			Type	Type		
[1]	M	2	Cystitis	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	SHV-12	Recovery	
[2]	F	3	Severe chronic obstructive bronchiolitis	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	CTX-M-15	-	-	Recovery	
[3]	M	5	RF	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	CTX-M-15	-	SHV-11	Recovery	
[4]	M	6	ALL	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	CTX-M-15	-	SHV-12	Recovery	
[5]	M	7	Acute pyelonephritis	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	Recovery	
[6]	M	9	Respiratory distress	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	SHV-32*	Death	
[7]	M	10	Leukemia	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	CTX-M-15	-	SHV-28*	Death	
[8]	M	10	ALL	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	SHV-11*	Recovery	
[9]	M	12	ALL	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	Recovery	
[10]	F	18	Lymphoma	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	SHV-133*	Death	
[11]	F	24	ND	<i>K. pneumoniae</i>	CASE	CTX-M-15	-	-	Recovery	
[12]	M	24	Respiratory distress	<i>K. pneumoniae</i>	WILD TYPE	-	-	SHV-28	Death	
[13]	F	30	Leukemia	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	Death	
[14]	M	36	Leukemia	<i>K. pneumoniae</i>	CASE+PASE	-	TEM-1	-	Death	
[15]	M	48	Lymphoma	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	Death	
[16]	M	48	Lymphoma	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	Death	
[17]	M	48	Chronic obstructive broncholitis	<i>K. pneumoniae</i>	WILD TYPE	-	-	-	Recovery	
[18]	M	60	Meningitis	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	Recovery	
[19]	M	60	Cystitis	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	TEM-1	SHV-28	Recovery	
[20]	F	72	Acute pyelonephritis	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	Recovery	
[21]	M	72	Lymphoma	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL+CASE	CTX-M-15	-	-	Recovery	
[22]	M	156	Respiratory distress	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	CTX-M-15	-	-	Death	
[23]	M	168	ND	<i>K. pneumoniae</i>	WILD TYPE	-	-	-	Recovery	
[24]	M	3.3	Leukemia	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	-	TEM-1	SHV-12	Death	
[25]	F	3	Cystitis	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	Recovery	
[26]	F	5	Leishmaniasis kala-azar	<i>E. cloacae</i>	PASE	-	-	-	Recovery	
[27]	F	5	ALL	<i>E. cloacae</i>	ESBL	-	TEM-1	-	Recovery	
[28]	M	5	Anemia	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	-	TEM-1	-	Recovery	
[29]	M	8	Pulmonary + Anemia	<i>E. cloacae</i>	CASE HYPER PRODUCT	-	TEM-1	SHV-12	Recovery	
[30]	F	24	Leishmaniasis kala-azar	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	CTX-M-15	TEM -136*	SHV-12	Death	
[31]	M	24	Acute pyelonephritis	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	-	TEM-1	-	Death	
[32]	M	36	Respiratory distress	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	-	TEM-1	-	Death	
[33]	M	36	Cystitis	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	-	TEM-1	SHV-12	Death	
[34]	M	48	Lymphoma	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	-	TEM-1	SHV-12	Death	
[35]	M	108	Leukemia	<i>E. cloacae</i>	ESBL+CASE	-	-	-	Death	

Patient profile						CTX-M	TEM	SHV	Outcome
code	Sex	Age (months)	Reasons for hospitalization	Strain	Antibiotic phenotype	Type	Type	Type	
[36]	M	2	Leishmaniasis kala-azar	<i>E.coli</i>	ESBL	-	-	-	Death
[37]	M	24	Leishmaniasis kala-azar	<i>E.coli</i>	PASE	-	TEM-1	-	Recovery
[38]	F	168	ALL	<i>E.coli</i>	ESBL	-	-	-	Recovery
[39]	M	8	Cystitis	<i>S. marcescens</i>	ESBL+CASE	-	-	-	Recovery
[40]	M	8	Respiratory distress	<i>S. marcescens</i>	ESBL	-	-	-	Death
[41]	M	12	Lymphoma	<i>S. marcescens</i>	ESBL+CASE	-	-	-	Death
[42]	M	12	Anemia	<i>S. marcescens</i>	ESBL	-	-	-	Recovery

Table 2. Primers and probes used in this study.

Target	Primer name	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Reference/source
CTX-M	CTX Szabo R	TGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	334	Edelstein et al., 2003
	CTX Szabo F	TCACKCGGRTCGCCNGGRAT		
TEM	TEM Szabo R	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	862	Kruger et al., 2004
	TEM Szabo F	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
SHV	SHV Szabo R	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	998	Yagi et al., 2000
	SHV Szabo F	TTTATGGCGTTACCTTTGACC		

as follow: *Serratia marcescens* (n=4), 100%; *Enterobacter cloacae* (n=11), 81.81%; *Klebsiella pneumoniae* (n=19), 79.16%; and *Escherichia coli* (n=3), 66.66%. The antimicrobial resistance pattern of the isolates is shown in Figure 1. PCR amplification using specific primers, and sequencing showed that one ESBL-producing isolate of *E. cloacae* contained TEM-136, and five *K. pneumoniae* had the following genes: SHV-28 (n=3), SHV-32 (n=1) and SHV-133 (n=1).

Seventeen of 34 (50%) patients with ESBL-producing isolates died while in the hospital within 20 days after admission, and 2 of 8 (25%) patients with non-ESBL-producing isolates died within 10 days after admission. Although the mortality associated with non-ESBL-producing isolates is greatest during the first days after admission, the mortality associated with sepsis due to ESBL-

producing isolates peaked more than 20 days after admission. Patients with septicemia due to ESBL-producing strains had a significantly higher fatality rate than those with non-ESBL-producing isolates (50% versus 25%, $P=0.038$).

DISCUSSION

Our understanding of the origin and spread of antibiotic resistance in the microbial community remains low. Antibiotic resistance genes can be found in areas with only minimal or hypothetical antibiotic exposure, such as municipal waste water treatment plant effluents in the Czech Republic, aquaculture facilities in northwestern Wisconsin, USA, and in human communities living in very remote areas (Peruvian Amazonas) (Rolain et al.,

2012; Dolejska et al., 2011; Seyfried et al., 2010; Bartoloni et al., 2009).

There is a lack of epidemiological data in the Maghreb countries, and very few studies are published concerning ESBLs among the Enterobacteriaceae (Bourjilat et al., 2011; Lahlaoui et al., 2012) (Table 3). Comparing data from Mediterranean regions according to the resistance surveillance system of 2009 (EARSS), the incidence of ESBL-producing *K. pneumoniae* (ESBL-KP) lies between 73 and 100% in the following countries: Greece, Hungary, Latvia, Lithuania, Romania, Bulgaria, and Macedonia. Regarding ESBL-producing *E. coli* (ESBL-EC), the incidence ranges between 85 and 100% in more than half of the reporting countries, including Germany, France, Belgium, Denmark, Norway, Finland, Ireland, Spain, UK, Italy, Portugal, Greece and Austria. (EARS-Net., 2009).

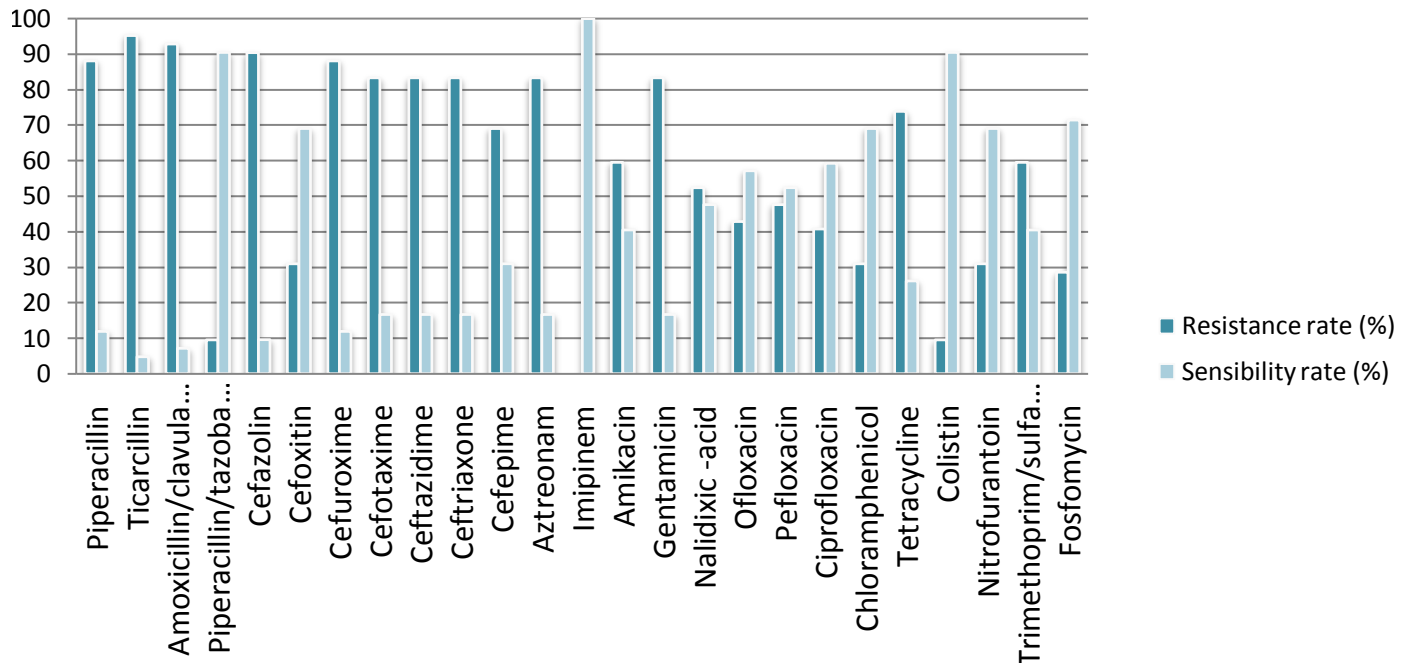


Figure 1. Results of antibiotic susceptibility for ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* from blood samples.

An analysis of our results showed that the rate of ESBL-producing *K. pneumoniae* (79,16%) was significantly higher compared to results reported in 2008 in Algiers with a prevalence of 19.9% for ESBL-producing *K. pneumoniae* (Messai et al., 2008), and compared to results reported in October 2011 in Algeria with a prevalence of 26.8% for these strains (Nedjai et al., 2012). TEM-136 has previously been reported in *K. pneumoniae* from Italy; (Bagattini et al., 2006) however, this is the first report of the TEM-136 genotype in the African continent, particularly in Annaba, Algeria. SHV-28 was first discovered in Tanzania (Ndugulile et al., 2005) and has since been reported in many parts of the world, such as Italy, United-Arab-Emirates, Brazil and China (Perilli et al., 2011; Alfaresi et al., 2011; Veras et al., 2011; Shi et al., 2009). However, this is the first detection of SHV-28 in Algeria. Also, we report the first isolation of SHV-32 in our country. This last one has been found in Palestine, Canada and Spain (Hussein et al., 2009; Melano et al., 2006; Chaves et al., 2001). Furthermore, our study is the first report of the high prevalence of ESBL-producers, including TEM-136, SHV-28 and SHV-32, among Enterobacteriaceae from blood cultures of children. We show that TEM and SHV are widespread among Enterobacteriaceae isolates that are multidrug resistant. We also demonstrate that sepsis caused by these Enterobacteriaceae is associated with very high fatality rates (Blomberg et al., 2005). Patients with sepsis due to ESBL-producing organisms had a significantly higher fatality rate than those with non-ESBL-producing strains. The prescription of several types of β -lactamases, particularly C3G; self-

medication; a long stay in the hospital; a prescription by unqualified health professionals; the late initiation of the appropriate treatment; inappropriate chemotherapy; the presence of a central venous, mechanical ventilation; and a longer time for admission to blood culture were the major significant risk factors for infection with ESBLs and significantly associated with a fatal outcome. There was no independent risk factor associated with a higher mortality rate (Tuon et al., 2011; Hsieh et al., 2010). The hospitalization rate for sepsis has almost doubled in the last decade (Khan et al., 2012); the frequency of sepsis was slightly higher in the present study as compared to previous studies that showed a lower mortality rate in children with septicemia caused by ESBL-producing strains (Kim et al., 2002; Zaoutis et al., 2005). The rise in the mortality rate is generally considered not to be due to increased disease severity in patients presenting with ESBL-producing organisms but rather due to higher rates of treatment failure because health care settings, especially in developing countries, do not follow any specific policy for antibiotic use (Khan et al., 2012).

Sepsis represents a current problem in Annaba Sainte-Therese's Hospital. Problems associated with sepsis include infection with multidrug-resistant Enterobacteriaceae (especially ESBLs), which are difficult to treat and are associated with increased mortality. Additionally, the emergence of a combination of resistance genes in Enterobacteriaceae may pose a public health risk, thus substantially restricting the therapeutic alternatives. We believe that a change in the empirical approach to treatment is necessary, mainly with regards to patients

Table 3. Table summarizing the genes encoding ESBLs in samples from Algeria

Clinical strain	Number of strains	ESBL		City	Reference
		SHV	CTX-M		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	ND	CTX-M -15	Bejaia	Touati et al., 2006
<i>Escherichia coli</i>	1	ND	CTXM-15		
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	ND	CTX-M-15 (2)	Bejaia	Touati et benalloua 2006
<i>Escherichia coli</i>	3	ND	CTX-M-15 (3)	Algiers	Messai et al., 2006
<i>Escherichia coli</i>	16	ND	CTX-M-15 (13)	Algiers	Ramdani-Bougoussa et al., 2006
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	ND	CTX-M-3 (3)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	ND	CTX-M-1 (25)	Algiers	Messai et al., 2008
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	ND	CTX-M -3		
<i>Enterobacter cloacae</i>	25	SHV-12(4)	CTX-M-15	Algiers	Iabadene et al., 2008
<i>Enterobacter cloacae</i>	25	SHV-12(4)	CTXM-15 (1)		
<i>Escherichia coli</i>	1	ND	CTX-M -15	Algiers	Iabadene et al., 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	ND	CTX-M-15		
<i>Serratia marcescens</i>	1	ND	CTX-M-15	Algiers	Iabadene et al., 2009
<i>Proteus mirabilis</i>	1	ND	CTX-M-15		
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	SHV-12		Annaba	Meradi et al., 2011
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	SHV-11	CTX-M-28 (2)		
<i>Enterobacter cloacae</i>	3			Annaba	Meradi et al., 2011
<i>Proteus mirabilis</i>	7	ND			
<i>Escherichia coli</i>	7	ND		Annaba	Meradi et al., 2011
<i>Morganella morganii</i>	2	ND	ND		
<i>Proteus vulgaris</i>	3	ND	ND	Annaba	This study
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	SHV-11(2)	CTX-M-15(8)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	SHV-12(3)		Annaba	This study
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	SHV-28(3)			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	SHV-32(1)		Annaba	This study
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	SHV-133(1)			
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	SHV-12(5)	CTX-M-15(2)	Annaba	This study
<i>Escherichia coli</i>	3	ND	ND		
<i>Serratia marcescens</i>	4	ND	ND		

with sepsis during hospitalization, which can decrease the global mortality of patients infected by ESBL-producing Enterobacteriaceae and that the implementation of a strict hospital infection control policy, including efforts to promote a judicious use of antibiotics, are needed. Continuous monitoring of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the community and in the hospital setting is also required, as is the early detection of sepsis, which could be one of the major keys to reducing the high mortality rate of sepsis in developing countries.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly funded by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and IHU Méditerranée Infection.

REFERENCES

- Alfaresi MS, Elkoush AA, Alshehhi HM, Abdulsalam AI (2011). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United Arab Emirates. *Med. Princ. Pract.* 20(2): 177-180.
- Allareddy V, Rampa S, Allareddy V (2012). Hospital charges and length of stay associated with septicemia among children hospitalized for leukemia in the United States. *World. J. Pediatr.* 8(3):222-328.
- Anastay M, Lagier E, Blanc V, Chardon H (2012). Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) Enterobacteriaceae in a General Hospital, South of France, 1999-2007. *Pathol Biol.* 61(2):38-43.
- Antimicrobial Resistance surveillance in Europe (2009). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
- Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, Gentile F, Scarcella A, Triassi M, Villari P, Zarrilli R (2006). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57(5): 979-982.

- Bartoloni A, Pallecchi L, Rodríguez H, Fernandez C, Mantella A, Bartalesi F, Strohmeyer M, Kristiansson C, Gotuzzo E, Paradisi F, Rossolini GM (2009). Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33(2): 125-129.
- Blomberg B, Jureen R, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile DS, Urassa WK, Fataki M, Msangi V, Tellevik MG, Maselle SY, Langeland N (2005). High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *J. Clin. Microbiol.* 43 (2): 745-749.
- Bourjilat F, Bouchrif B, Dersi N, Claude JD, Amarouch H, Timinouni M (2011). Emergence of Extended-Spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in community-acquired urinary infections in Casablanca, Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5(12):850-855
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE; WHO Child Health Epidemiology Reference Group (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet.* 365(9465):1147-1152.
- Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(12): 894-896.
- Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C (2001). SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(10):2856-2861.
- De Kraker ME, Davey PG, Grundmann H, BURDEN study group (2011). Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLOS. Med.*8(10): e1001-1004.
- Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, Cizek A, Guenther S, Literak I (2011). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella spp.* isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(12): 2784-2790.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47(12): 3724-3732
- Hsieh CJ, Shen YH, Hwang KP (2010). Clinical implications, risk factors and mortality following community onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and non ESBL producing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 43(3): 240-248.
- Hussein AI, Ahmed AM, Sato M, Shimamoto T (2009). Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Palestinian hospitals. *Microbiol. Immunol.* 53(11): 595-602.
- Ibadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R, Arlet G (2008). Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 62(1): 133-136.
- Ibadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, Arlet G (2009). Prevalence of plasmid-mediated Amp C beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34(4): 340-342.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10(4): 867-878.
- Khan MR, Maheshwari PK, Masood K, Qamar FN, Haque AU (2012). Epidemiology and Outcome of Sepsis in a Tertiary Care PICU of Pakistan. *Indian. J. Pediatr.* 79(11):1454-1458
- Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi, EH, Kim J, Kim JH, Kim EC (2002). bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(5):1481-1491.
- Kruger T, Szabo D, Keddy KH, Deeley K, Marsh JW, Hujer AM, Bonomo RA, Paterson DL (2004). Infections with non typhoidal Salmonella species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48(11): 4263-4270.
- Lahlaoui H, Anis BH, Mohamed K, Mohamed BM (2012). Emergence of SHV-12 extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Tunisia. *Microb. Pathog.* 53(12):64-65.
- Melano RG, Davidson RJ, Musgrave HL, Forward KR (2006). Cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Nova Scotia, Canada. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*56(2): 197-205.
- Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Perrier Gros Claude JD, Timinouni M (2011). Qnr and aac (6)-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol.* 59(4) : e73-78.
- Messai Y, Benhassine T, Naim M, Paul G, Bakour R (2006). Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Rev. Esp. Quimioter.*19(2):144-151.
- Messai Y, Ibadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol.* 56(5):319-325.
- Ndugulile F, Jureen R, Harthug S, Urassa W, Langeland N (2005). Extended spectrum beta-lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an intensive care unit of a tertiary health facility in Tanzania. *BMC. Infect. Dis.* 5: 86.
- Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med Mal Infect.* 42(1): 20-29.
- Oteo J, Cercenado E, Fernández-Romero S, Saéz D, Padilla B, Zamora E, Cuevas O, Bautista V, Campos J (2012). Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of pediatric infections: report of a neonatal intensive care unit outbreak due to a CTX-M-14-producing strain. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 56(1):54-58.
- Perilli M, Segatore B, Mugnaioli C, Celenza G, Rossolini GM, Stefani S, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G (2011). Persistence of TEM-52/TEM-92 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Italy. *Microb. Drug. Resist.* 17(4): 521-524.
- Ramdani-Bouguessa N, Mendonça N, Leitão J, Ferreira E, Tazir M, Caniça M (2006). CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J. Clin. Microbiol.*44(12): 4584-4586.
- Rolain JM, Canton R, Cornaglia G (2012). Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(7): 615-616.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49(4): 543-551.
- Soussy CJ, société française de microbiologie ; comité d'antibiogramme de société française de microbiologie ; recommandations 2011 ; CA-SFM ; 2012.
- Shi WF, Zhou J, Qin JP (2009). Transconjugation and genotyping of the plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Chin. Med. J. (Engl.)*122(9): 1092-1096.
- Seyfried EE, Newton RJ, Rubert KF 4th, Pedersen JA, McMahon KD (2010). Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. *Microb. Ecol.* 59(4): 799-807.
- Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, de Champs C (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents.*27(5): 397-402.
- Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Madoux J, Gharout A, de Champs C (2008). *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. *J. Hosp. Infect.* 68(2): 183-185.
- Tuon FF, Kruger M, Terreri M, Penteado-Filho SR, Gortz L (2011). *Klebsiella* ESBL bacteremia mortality and risk factors. *Braz. J. Infect. Dis.*15(6): 594-598.
- Veras DL, Alves LC, Brayner FA, Guedes DR, Maciel MA, Rocha CR, de Souza Lopes AC (2011). Prevalence of the bla (SHV) gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and commu-

- nity infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. *Curr. Microbiol.* 62(5): 1610-1616.
- Weill FX, Perrier-Gros-Claude JD, Demartin M, Coignard S, Grimont PA (2004). Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing strains of *Salmonella enterica* isolated in France and Senegal. *FEMS. Microbiol. Lett.* 238(2): 353-358
- Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y (2000). A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS. Microbiol. Lett.* 184(1): 53-56.
- Zaoutis TE, Goyal M, Chu JH, Coffin SE, Bell LM, Nachamkin I, McGowan KL, Bilker WB, Lautenbach E (2005). Risk factors for and outcomes of bloodstream infection caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in children. *Pediatrics.* 115(4):942-949.