

## ARTICLE ORIGINAL

## Étude comparative des méthodes de détection phénotypique des BLSE chez les entérobactéries

### Comparative study phenotypic detection of methods of ESBL in Enterobacteriaceae

Yomna Ben Lamine<sup>2</sup>,  
Ines Abene<sup>2</sup>,  
Rim Ben Jemaa<sup>1</sup>,  
Sophia Bouhalila-Besbes<sup>1,2</sup>.

1 Laboratoire de biologie médicale, unité de microbiologie, Institut Mohamed Kassab d'Orthopédie.

2 Faculté de Pharmacie de Monastir

#### Résumé

**Introduction :** La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Ces bactéries sont responsables d'infections aussi bien nosocomiales que communautaires. Le but de ce travail était d'étudier différentes méthodes de détection phénotypiques des BLSE chez les entérobactéries afin de détecter ces enzymes.

**Matériel et méthodes :** il s'agit d'une étude rétrospective réalisée au service de biologie médicale, unité de microbiologie, à l'Institut Mohamed Kassab d'Orthopédie et qui a porté sur 73 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

**Résultats :** notre étude a révélé que les résultats de détection des BLSE varient selon la méthode. Le test de dépistage sur milieu chromogène nous a permis de détecter 71 souches productrices de BLSE. Le test de double synergie a mis en évidence 58 souches BLSE sans rapprochement, 64 après rapprochement et 67 en présence de la cloxacilline. La méthode des disques combinés et le test des doubles disques ont permis de détecter 72 souches.

**Conclusion :** La détection phénotypique des BLSE par les méthodes associant les céphalosporines et les inhibiteurs de bêta-lactamases pourrait être la stratégie la plus utile. La confirmation et la différenciation entre les différents types de BLSE ne peut être faite que par la biologie moléculaire.

**Mots clés :** Entérobactéries, BLSE, méthodes phénotypiques

#### Abstract

**Introduction:** The resistance of Enterobacteriaceae to antibiotics is experiencing a worrying global trend with an increasing impact of extended spectrum beta-lactamases (ESBL). These bacteria are responsible for infections both nosocomial and community. The aim of this work was to study different methods of phenotypic detection of ESBL in *Enterobacteriaceae* in order to establish an effective strategy for the detection of these enzymes.

**Materials and methods:** This is a retrospective study carried out in the Department of Clinical Biology and Blood Bank, Microbiology Unit, at the Mohamed Kassab Institute of Orthopedics and covered 73 strains of *Enterobacteriaceae* resistant to 3rd generation cephalosporin.

**Results:** Our study found that ESBL detection results varied by method. The screening test on chromogenic medium allowed us to detect 71 strains producing ESBL. The double synergistic test revealed 58 ESBL strains without approximation, 64 after closure and 67 in the presence of cloxacillin. The combined disc method and the dual disk test detected 72 strains.

**Conclusion:** Phenotypic detection of ESBL by methods combining cephalosporins and beta-lactamase inhibitors could be the most useful strategy. Confirmation and differentiation between different types of ESBL can only be made by molecular biology.

**Key words:** *Enterobacteriaceae*, ESBL, phenotypic methods.

## INTRODUCTION

La résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution et développe en permanence différents mécanismes comme les bêta- lactamases à spectre étendu (BLSE) [1]. La fréquence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques a atteint, partout dans le monde, des proportions inquiétantes et est devenue un problème majeur de santé publique. Parmi ces bactéries, les plus fréquemment rencontrées actuellement sont les entérobactéries productrices des BLSE (E-BLSE) [2]. Elles représentent une menace pour l'avenir par leur impact sur la morbidité et la mortalité, ainsi que les choix thérapeutiques de plus en plus difficiles et incertains, prolongeant l'hospitalisation et augmentant les coûts des traitements. Alors que ce problème était essentiellement d'ordre hospitalier, la diffusion d'aujourd'hui à grande échelle des E-BLSE dans le milieu communautaire est devenue un phénomène préoccupant [3]. L'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques en santé humaine et en milieu vétérinaire pourrait être à l'origine de ce problème. Afin d'éviter, tant l'apparition que la diffusion de telles résistances, les microbiologistes doivent détecter aisément leur présence dans un délai optimal permettant ainsi aux cliniciens de prendre les mesures de préventions telles que le bon usage des antibiotiques et l'application rigoureuse des règles d'hygiène [2]. Le but principal de notre travail est d'étudier les différentes méthodes phénotypiques de détection des BLSE afin d'établir une meilleure démarche diagnostique de ce phénotype de résistance aux bêta-lactamines au niveau du laboratoire. Nous avons également évalué l'efficacité

d'un milieu chromogène dans la détection des E-BLSE dans le but d'instaurer une politique de dépistage.

## MATERIEL ET METHODES

Nous avons effectué l'étude de 73 entérobactéries isolées à l'institut Mohamed Kassab d'orthopédie l'IMKO sur la période allant du 01 janvier 2013 au 30 mars 2015. Ces souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ont été détectées selon les critères du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2013) [17] puis colligées à partir du système expert de lecture d'antibiogramme (SIRscan- i2a). Les isolats proviennent de différents prélèvements à visée diagnostique et issus de tous les services de médecine et de chirurgie de l'établissement.

L'identification des entérobactéries s'est basée sur les caractères suivants: culturaux (croissance aéro-anaérobie sur une gélose nutritive ordinaire après incubation 24h heures à 37° C), morphologiques (après une coloration de Gram.) et biochimiques (galerie API 20E®).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton conformément aux recommandations de CA-SFM en 2013. La lecture a été faite après 18-24h d'incubation à 35-37°C.

La présence de BLSE est suspectée devant toute diminution de diamètre d'inhibition autour des disques de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et/ou 4<sup>ème</sup> génération et/ou monobactame.

La démarche méthodologique suivie pour la détection des BLSE est représentée dans la figure1;

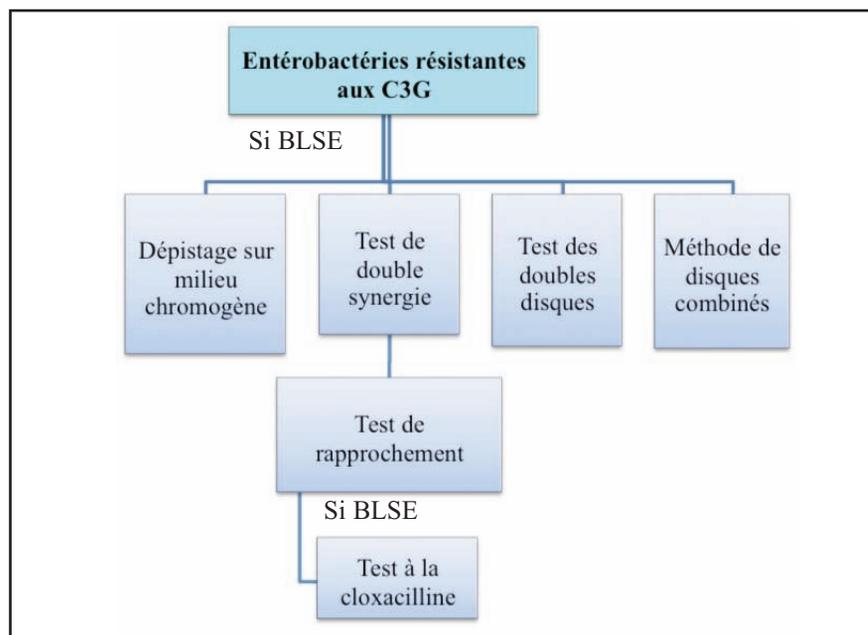


Figure 1: Méthodologie suivie pour la détection des entérobactéries productrices de BLSE

### Le dépistage sur milieu chromogène

Nous avons utilisé les milieux chromogènes ChromID ESBL de bioMérieux. Le principe de ces milieux différentiels, est basé sur la sélection des E-BLSE grâce à une base nutritive additionnée d'un mélange d'antibiotiques, incluant le céfpodoxime. A partir d'une culture pure de 18-24 h sur gélose ordinaire, les colonies ont été repiquées sur le milieu chromogène. Après 18 à 24 h d'incubation à l'étuve à 37°C, l'identification des souches a été faite grâce à la présence de colonies et leurs pigmentations caractéristiques (*Escherichia coli* ; rose à bordeaux, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter (KESC)*; bleue à verte, les *Proteae* ; Brune à marron)

### Les tests de confirmation phénotypiques

Tous les tests ont été effectués selon les recommandations du CA-SFM 2013, Le test de double synergie, le test des doubles disques et la méthode des disques combinés ont été réalisés à partir du même inoculum.

**Le test de double synergie** consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10µg) et un disque de C3G (cef-tazidime (CAZ) 30µg et/ou cefotaxime (CTX) 30µg) et/ou C4G (céfépime (FEP) 30µg) et/ou un monobactame (aztréonam (ATM) 30 µg). Une distance de 30 mm a été respectée entre le centre des disques. La présence d'image de synergie dite « bouchon de champagne » est caractéristique de la présence de BLSE.

Les souches ayant des résultats négatifs au test de double synergie, ont été testées par la **méthode de rapprochement des disques** de C3G et/ou C4G et/ou l'aztréonam (20 mm) du disque de l'AMC.

La détection de la production d'une BLSE est parfois difficile compte tenu d'une éventuelle coproduction d'une céphalosporinase de haut niveau (Cases), Nous avons utilisé la **méthode à la cloxacilline** qui est un inhibiteur de céphalosporinase. La cloxacilline, ajoutée au milieu MH (0,25mg/ml pour les entérobactéries du groupe 1 et 2 et 0,3mg/ml pour celles du groupe 3), inhibe in vitro les Cases et reste inefficace sur les pénicillina-ses des bacilles à Gram négatif. Ce test est interprété en comparant le test de synergie réalisé sur MH additionné de cloxacilline à celui réalisé sur MH sans cloxacilline. Il est considéré positif s'il y a une apparition d'une image ou plusieurs images de synergie. La présence d'une éventuelle céphalosporinase de haut niveau associé à la BLSE est traduite par la restauration des diamètres d'inhibition autour des céphalosporines.

Pour le **test des doubles disques**, après avoir ensemencé le milieu MH, nous avons placé deux disques d'AMC, un disque de CTX et un disque de FEP à une distance de 25 mm, laissé diffuser pendant une heure de temps à 37°C puis nous avons remplacé les disques d'AMC par

le disque correspondant à la céphalosporine étudiée. Le test a été considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G ou C4G appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC était  $\geq 5$  mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de la céphalosporine seule.

**La méthode des disques combinés** consiste à placer deux couples d'antibiotiques: un disque de CTX (30 µg) en regard d'un disque CTXC (cefotaxime + acide clavulanique ; 30µg/10µg) et un disque de FEP (30µg) en regard d'un disque de FEPC (céfépime + acide clavulanique ; 30µg/10µg) à une distance de 30mm centre à centre. Une différence de diamètre  $\geq 5$ mm entre les disques contenant l'acide clavulanique par rapport à ceux qui n'en contiennent pas est en faveur de la présence de BLSE.

## RESULTATS

**Le test sur milieu chromogène** a permis de détecter 71 souches parmi les 73 souches testées. Six souches ont poussé sur ce milieu sans donner de pigmentations caractéristiques qui permet leur identification. Parmi les 28 *E. coli* isolées, 4 souches ont produit des colonies incolores au lieu d'une coloration rose et une n'a pas poussé. Dans le groupe de KESC, deux entérobactéries (*1 K.pneumoniae et 1 E.cloacae*) n'ont pas donné leur pigmentation spécifique, donnant respectivement des colonies incolores et brunes. Une seule souche de *K.pneumoniae* n'a pas poussé sur ce milieu.

**Le test de double synergie** : Seulement 58 (79%) souches ont été détectées par ce test ont présenté une image de synergie avec l'AMC avec un ou plusieurs disques.

### La méthode de rapprochement des disques

Les 15 souches ayant des résultats négatifs au test précédent ont été testées par la méthode de rapprochement des disques. Les résultats obtenus ont été comme suit: 6 souches présentaient des images de synergie: BLSE (+) et 9 souches présentaient des tests négatifs. Nous avons noté que parmi les 6 souches productrices de BLSE, 2 isolats présentaient 4 images de synergie avec les disques d'ATM, CAZ, FEP et CTX et 4 isolats présentaient 2 images de synergie avec les disques d'ATM et FEP.

### La méthode à la cloxacilline

Les 9 souches ayant des résultats négatifs par la méthode de rapprochement ont été testées par la méthode à la cloxacilline qui a révélé les résultats suivants:

L'absence d'images de synergie chez 6 souches testées dont une présente un élargissement des diamètres des

antibiotiques. L'image de synergie a été observée chez 3 souches présentant le phénotype BLSE + Céphalosporine AmpC (2 *K.pneumoniae* (figure 2) et 1 *E.coli*)

**Le test des doubles disques**

Sur les 73 souches testées : 65 bactéries BLSE ont été détectées par les deux disques de CTX et FEP (figure 3), 7 souches BLSE (+) n'ont été détectées que par le disque de FEP précédé par l'application d'AMC mais aucune souche n'est détectée par le disque de CTX seul. Au total le test des doubles disques a détecté 72 souches productrices de BLSE soit 98.6%.

**La méthode des disques combinés**

La différence des diamètres de la zone d'inhibition a montré que: 65 bactéries BLSE ont été détectées par les deux disques de CTX et FEP (figure 4), 2 souches BLSE (+) n'ont été détectées que par les disques de CTX/CTXC et 5 souches BLSE (+) n'ont été détectées que par les disques de FEP/FEPC. Au total, la méthode des disques combinés a détecté 72 souches productrices de BLSE soit 98.6%.

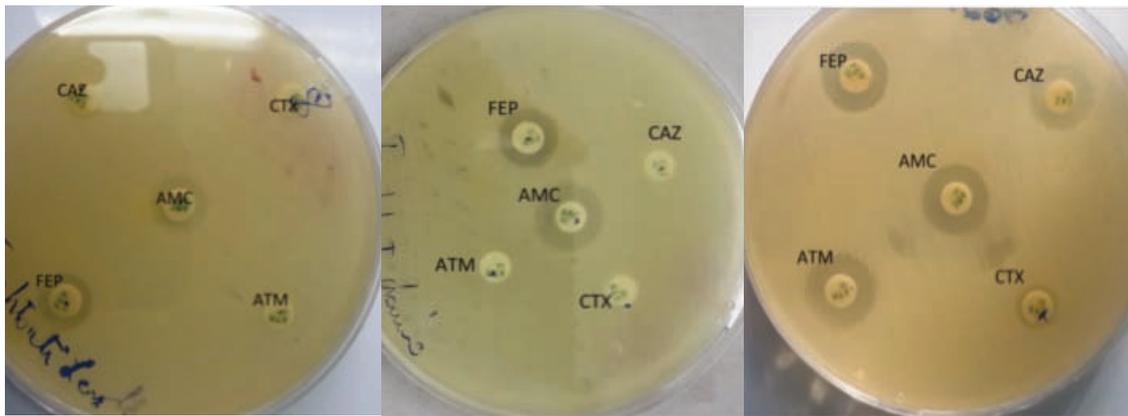


Figure 2: Une souche de *K. pneumoniae* ayant des résultats négatifs dans a) le test de double synergie et b) le test de rapprochement des disques, présentant un test de double synergie à la cloxacilline positif.

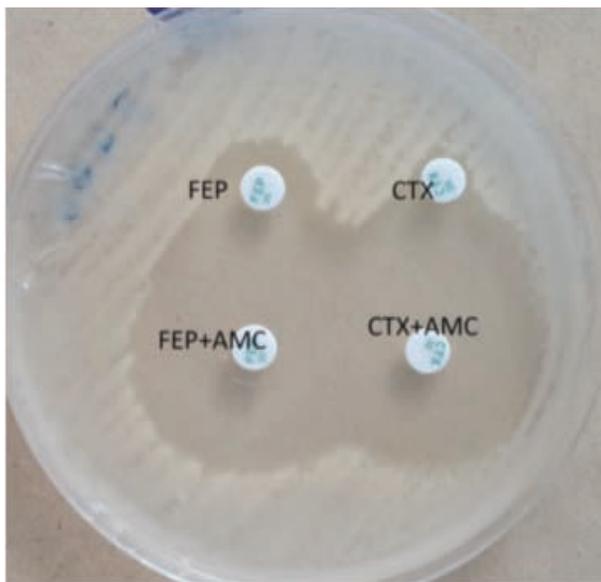


Figure 3: Test des doubles disques positif chez une *K. pneumoniae*.

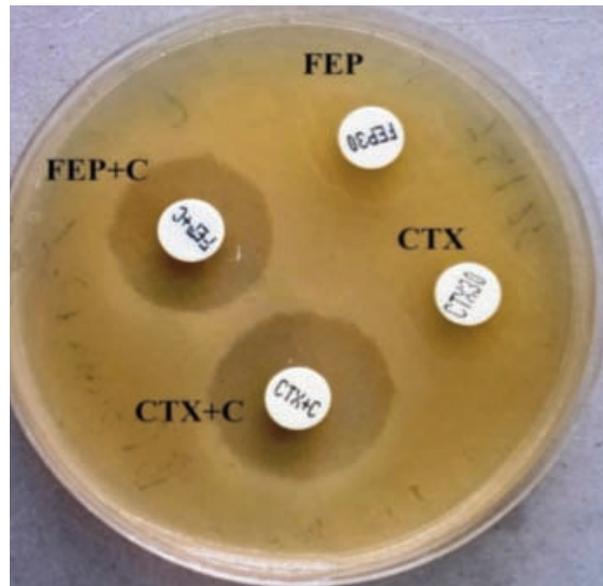


Figure 4: Test de disques combinés positif chez une souche d'*E.coli*.

## Synthèse des résultats des tests phénotypiques

Les différents résultats des tests de détection phénotypiques des BLSE chez les entérobactéries figurent dans le tableau 1.

## DISCUSSION

Les entérobactéries multirésistantes ont une responsabilité croissante dans les infections à la fois communautaires et nosocomiales [4]. Afin de prévenir et/ou de ralentir la diffusion de la résistance bactérienne, les microbiologistes doivent disposer de méthodes adaptées pour détecter précocement les souches productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. La mise en évidence de ce phénotype est parfois délicate à réaliser, ce qui amène le microbiologiste à optimiser les différents moyens de détection des BLSE.

**Le test de dépistage sur milieu chromogène** nous a permis de détecter 71 entérobactéries productrices de BLSE (97,2%) parmi les 73 souches isolées. Sur les 28 *E.coli* isolées, 4 souches ont produit des colonies incolores et une n'a pas poussé.

Dans une étude menée par Huang et al. [5] en 2007, évaluant les performances des milieux chromogènes, 4 *E. coli* productrices de BLSE parmi les 70 E-BLSE isolées ont produit des colonies incolores sur le milieu chromID, soit 5%. Katuzna et al. [6], dans une étude réalisée en 2014, ont rapporté que ce test a détecté 95.2% des *E.coli* BLSE (+). Seulement 2 souches n'ont pas poussé parmi les 40 *E.coli* isolées. Dans le groupe KES,

nous avons trouvé que deux espèces d'entérobactéries (*K.pneumoniae* et *E.cloacae*) n'ont pas donné de pigmentations spécifiques, donnant des colonies incolores et brunes respectivement. Une seule souche de *K.pneumoniae* n'a pas poussé sur ce milieu. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Huang TD et al. [5], qui rapportaient que les 16 entérobactéries BLSE du groupe KES ont été détectées présentant les colonies vertes sur le milieu ChromID. Toutefois, Willems et al. [7] ont trouvé que parmi 13 *E.cloacae* BLSE testées, deux souches seulement n'ont pas produit des pigments spécifiques prévus sur le même milieu chromogène. Glupczynski et al. [8], ont rapporté une sensibilité de 97.7 % et une spécificité de 89 % pour ce type de milieu. Réglie-Poupet [9], a trouvé une sensibilité inférieure (88 %) parce que 4 parmi les 33 E-BLSE ont échoué à produire des colonies colorées. Overdeest et al [10], ont trouvé une sensibilité de 98.5% mais une spécificité inférieure de 44.3% car 39 entérobactéries non BLSE ont poussé sur le milieu chromogène parmi les 65 entérobactéries isolées. Ceux-ci pourraient être des entérobactéries hyper-productrices de céphalosporinase ou *K.oxytoca* hyper-productrice de pénicillinase et/ou productrices de carbapénémases [5,11].

Hung TD et al. [5], ont effectué une comparaison entre deux différents milieux chromogènes dans la détection des E-BLSE : Brilliance ESBL agar (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) et le ChromID ESBL agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Ils ont rapporté que ces deux milieux avaient la même sensibilité (94.9%) et des spécificités semblables (94.9% pour chromID vs 95.1% pour Brilliance).

**Tableau1: Comparaison entre les différentes méthodes phénotypiques de détection des BLSE.**

Nombre de souches testées	Nombre et pourcentage (%) des souches BLSE positive par catégorie de test			
	Test de dépistage sur milieu chromogène	Test de double synergie et tests complémentaires	Test des doubles disques	Méthode des disques combinés
<i>K. pneumoniae</i> , n=36	35 (97,2)	30 (83,3)	35 (97,2)	35 (97,2)
<i>E. coli</i> , n=28	27 (96,4)	28 (100)	28 (100)	28 (100)
<i>E. cloacae</i> , n=8	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)
<i>K.oxytoca</i> , n=1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Total n=73	71 (97,2)	67 (91,7)	72 (98,6)	72 (98,6)

### Tests de confirmation

Le test de double synergie a permis de détecter 58 souches parmi les 73 souches productrices de BLSE (79.4%). Une étude algérienne de Touati et al. [12], a rapporté une sensibilité de 100% pour l'espèce *K. pneumoniae*. Ces résultats ne sont pas concordants avec ceux de notre travail (25 souches de *K. pneumoniae* détectées parmi 36 souches). Dans l'étude de Grover et al. [13], ils ont trouvé que 70.7% des *K. pneumoniae* productrices de BLSE ont été identifiées par ce test. De même, Biswas SM et al. [14], ont mis en évidence 63 parmi 82 souches BLSE en utilisant ce test. Cinq souches productrices de BLSE ont donné de faux résultats. Cela pourrait être en rapport avec la production de céphalosporinase AmpC qui donne de faux négatifs. Tzelepi et al. [15] ont noté une sensibilité de 61% par rapport à la biologie moléculaire. Cela peut être expliqué par l'association d'autres mécanismes de résistance aux bêta-lactamines comme l'hyperproduction de céphalosporinase type AmpC, imperméabilité et la variabilité de la densité de l'inoculum [16,17].

Devant la sensibilité moyenne de test de double synergie, méthode de détection des BLSE la plus utilisée dans les services de microbiologie, les sociétés savantes [17,18], recommandent d'associer ce test à d'autres techniques afin d'augmenter la probabilité de détection de ces enzymes [18].

**Le test de double synergie avec rapprochement des disques** a mis en évidence 6 souches E-BLSE par rapport au test de double synergie standard augmentant ainsi le nombre d'E-BLSE à 64 (soit 87.6%). Nos résultats sont en accord avec ceux de Garrec H et al. [18] qui ont rapporté que la réduction de distance entre les disques améliore la sensibilité du test de synergie et que la sensibilité atteint les 100%. De même, Tzelepi et al. [15], ont souligné que la sensibilité de ce test augmente de 61 % à 90% en réduisant la distance de 30mm à 20mm.

**Le test à la cloxacilline** a permis de détecter 3 souches BLSE de plus par rapport au test de rapprochement. Le nombre des E-BLSE a augmenté ainsi à 67 (91.7%). Ces trois souches étaient coproductrices de BLSE et de céphalosporinase AmpC qui masquait la visualisation de l'image de synergie. Nos résultats sont supérieurs à ceux d'Abid F et al. [19], qui ont trouvé que ce test a mis en évidence 20 souches BLSE parmi les 35 entérobactéries productrices de BLSE (57%). Katuzna et al. [6], ont rapporté que le test de double synergie avec la cloxacilline a une sensibilité élevée (95.2%). Dans une étude comparant les résultats de ce test pour la détection des BLSE chez *E. coli* à la biologie moléculaire, ont obtenu une sensibilité et spécificité de 100% [18]. Ces résultats illustrent la fiabilité de ce test, surtout chez l'espèce *E. coli*.

Les laboratoires de microbiologie clinique utilisent souvent les méthodes phénotypiques à la recherche de synergie entre l'AMC et les céphalosporines et/ou l'aztréonam. Cette synergie peut se voir avec un ou plusieurs disques en fonctions des différents types de BLSE. En effet, beaucoup d'enzymes de type TEM (Temoneira-Nom du patient) induisent une résistance plus importante à la ceftazidime et à l'aztréonam qu'au céfotaxime. Le groupe CTX-M (Cefotaximase-Munich) confère à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone), céfépime et l'aztréonam qu'à la ceftazidime, d'où leur nomination. Certaines d'entre elles ont évolué plus récemment par mutation (ponctuelle ou non) générant également un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles que les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 et CTX-M-32 [19].

**Le test des doubles disques** a permis de détecter au total 72 souches BLSE soit 98.6%. Nous avons noté que l'augmentation du diamètre d'inhibition autour du disque du céfépime précédé par la diffusion de l'AMC, sans variation de diamètre du disque céfotaxime, a été observée chez 7 souches. 65 E-BLSE ont été détectées par les deux disques CTX et FEP. Ceci pourrait être en rapport avec le spectre d'activité de la céphalosporine, la variation de l'expression phénotypique in vitro des BLSE et du niveau de leurs productions [20]. Dans notre travail, ce test a montré une meilleure sensibilité et a été considéré comme une technique qui donne des résultats fiables de confirmation de présence de BLSE chez les entérobactéries.

**Le test des disques combinés** permis de détecter 98.6% souches BLSE, des résultats similaires ont été rapportés par d'autres études avec une sensibilité de 92 % et de 96 % [18,21]. Toutefois, Poulou et al. [22], ont rapporté une sensibilité inférieure (65.4%). Ils ont montré que ce test avec les mêmes disques a mis en évidence 106 souches BLSE parmi les 164 E-BLSE. Dans l'étude de Garrec H et al. [18], ce test a montré une sensibilité plus élevée lorsqu'ils ont utilisé simultanément les disques combinés de céfotaxime et de céfépime par rapport au disque combiné de céfotaxime seul ou de céfépime seul. Ces résultats concordent avec ceux de notre travail. Cette différence pourrait être expliquée par le spectre d'activité de la céphalosporine et la variabilité d'affinité des souches par rapport à la céphalosporine utilisée ou encore par la coproduction d'une bêta-lactamase résistante aux inhibiteurs tels que l'AmpC qui va renforcer la résistance à l'aide clavulanique et induire ainsi des résultats faussement négatifs [23]. Des résultats qui pourraient être confirmés ou infirmés ultérieurement par des études moléculaires plus spécifiques.

D'après une étude faite à l'hôpital militaire de Tunis

[24], la sensibilité de détection des BLSE varie selon la méthode : elle était de 100% pour le test à la cloxacilline, de 97.87% pour la méthode des disques combinés, de 92% pour le test de rapprochement des disques. La sensibilité variait de 74.19% à 82.88% pour le test des doubles disques de synergie en fonction des disques testés. La spécificité des méthodes de diffusion en milieu gélosé était de 100%. Par la méthode automatisée en milieu liquide (Vitek®2 compact) la sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 87.79% et de 64.29%. D'après notre étude, la méthode des disques combinés et le test des doubles disques étaient les techniques les plus sensibles pour la détection phénotypique des E-BLSE. La première méthode présente l'avantage d'être plus facile à réaliser mais le deuxième test reste le moins coûteux. La détection des BLSE, basée sur les tests phénotypiques, représente la stratégie la plus utilisée en routine dans les laboratoires de microbiologie. Dans la majorité des cas, ces tests de sensibilité phénotypiques sont suffisants et leurs performances est en progression continue. Toutefois, Le principal inconvénient de ce procédé est de n'intervenir qu'environ 48 h après le prélèvement. L'obtention d'informations plus précoces en pathologies infectieuses aiguës pourrait permettre d'améliorer la qualité des choix de l'antibiothérapie initiaux, du moins de les adapter plus rapidement [25]. En outre, ces tests peuvent manquer de sensibilité et/ou spécificité. Ce problème de détection est accru chez les souches porteuses d'autres mécanismes de résistance comme la production

d'une céphalosporinase inductible ou la modification de porines responsables d'une imperméabilité [26].

Les techniques de biologie moléculaires sont capables de résoudre les difficultés de détection des BLSE. Elles restent les tests de référence, capables de confirmer la présence des BLSE chez les entérobactéries [26]. Elles donnent une idée sur l'épidémiologie des souches isolées afin de tracer une cartographie de la distribution des différentes bactéries en vue d'instaurer une stratégie de lutte contre leur dissémination.

## CONCLUSION

Au vu des résultats obtenus, le milieu chromogène pourrait être utilisé, dans notre laboratoire, dans le cadre de dépistage des E-BLSE dans les services à forte pression de sélection notamment le service d'anesthésie réanimation. Il pourrait être complété par un ou plusieurs tests de confirmation. Les deux méthodes des disques combinés et des doubles disques ont été retenues comme les méthodes les plus performantes en termes de détection phénotypique. La prévention reste le moyen le plus efficace pour lutter contre les infections nosocomiales. Une application stricte des mesures d'hygiène, une utilisation justifiée d'antibiothérapie et une instauration d'une politique de dépistage systématique pourraient conduire à une diminution significative de la fréquence des BLSE.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ruppé E. Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques* 2010;12:3-16.
2. Carle S. La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel* 2009;42 Suppl 2:6-21.
3. Rodriguez-Villalobos H, Struelens M. Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation* 2006;15:205-13.
4. Ben Redjeb S, Boutiba-Ben Boubaker I. L'antibiorésistance en Tunisie LART-Données 2004-2007. Tunis: Ministère de la Santé; 2008.
5. Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynski Y. Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2091-6.
6. Katuzna E, Zalas-Wiecek P, Gospodarek E. Comparison of detection methods for extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli strains. *Postepy Hig med dosw (Online)* 2014; 68:808-13.
7. Willems E, Cartuyvels R, Magerman K, Verhaegen J. Evaluation of 3 different agar media for rapid detection of extended-spectrum betalactamase-producing Enterobacteriaceae from surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76:16-9.
8. Glupczynski Y., Berhin C., Bauraing C. and Bogaerts P. Evaluation of a new selective chromogenic medium for detection of Extended-spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae. *J. Clin Microbiol* 2007; 45: 501-505.
9. Réglier-Poupet H1, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57: 310-315.

10. Overdeest IT, Willemsen I, Elberts S, Verhulst C, Kluytmans JA. Laboratory detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae : evaluation of two screening agar plates and two confirmation techniques. *J Clin Microbiol* 2011 ; 49 : 519-22.
11. BioMérieux. ChromID™ ESBL Milieu chromogène pour le dépistage des entérobactéries productrices de  $\beta$ -Lactamase à Spectre Étendu (BLSE). Isoler les colonies BLSE & Isoler les Patients [En Ligne]. [Consulté le 15/01/2016], disponible à partir de l'URL: [http://www.techmicrobio.eu/documentations\\_fabricants/BioMerieux%20et%20API/G%C3%99loses/bioMerieux\\_Chrom%20ID/bioMerieux\\_chrom%20id%20ESBL/chromID\\_ESBL.pdf](http://www.techmicrobio.eu/documentations_fabricants/BioMerieux%20et%20API/G%C3%99loses/bioMerieux_Chrom%20ID/bioMerieux_chrom%20id%20ESBL/chromID_ESBL.pdf)
12. Touati A, Medboua C, Touati D, Denine R, Brasme L, de Champs C. CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *Int Res J Microbiol* 2012; 3:181-5.
13. Grover SS, Sharma M, Chattopadhyaya D, Kapoor H, Pasha ST, Singh G. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. *J Infect* 2006; 53:279-88.
14. Biswas SM, Mia MRA, Ara N, Ibrahim M, Nasir TA, Yunus S. Comparison of three dimensional test and double disc synergy test for detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Gram negative bacteria. *Pulse* 2013;6:12-9.
15. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukva V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:542-6.
16. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
17. Société Française de Microbiologie. Recommandations 2013 du CA-SFM Paris: Société Française Microbiologie; 2013
18. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011;49:1048-57.
19. Dalèle Elhani. Les bêta-lactamases à spectre étendu: le défi s'accroît. *Ann Biol Clin* 2012 ; 70 (2) : 117-40.
20. Abid F, Boutefnouchet N, Dakhil M, Bouzerna N. *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. *Sci Study Res* 2007; 8:199-214.
21. Dashtii AA, West P, Paton R, Amyes SG. Characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Kuwait and UK strains identified by the Vitek system, and subsequent comparison of the Vitek system with other commercial ESBL-testing systems using these strains. *J Med Microbiol* 2006;55:417-21.
22. Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, Koumaki V, Pittaras T, Pournaras S, et al. Modified CLSI extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among Enterobacteriaceae producing various beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2014; 52:1483-9.
23. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003; 47:273-95.
24. El Asli M S. Détection phénotypique des BLSE chez les entérobactéries : comparaison de la méthode automatisée en milieu liquide et des méthodes de diffusion en milieu gélosé. [Thèse de diplôme national en pharmacie] Monastir : faculté de pharmacie ; 2015.
25. Billy C. Détection génotypique des résistances bactériennes: de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaires. *Reanimation* 2003; 12:192-7.
26. Dubouix A, Marty N. Détection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantages, limites. *Antibiotiques*. 2004; 6:193-201.