



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abou Bakr Belkaid– Tlemcen
faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la
terre et de l'univers



Département De Biologie

Mémoire

Réalisées par

Mme. BENOSMAN Manel

Melle. ZIANI CHERIF Manal

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option: Microbiologie fondamentale

Thème

**Etude de la résistance aux antimicrobiens de
certains bacilles à Gram négatif isolés du centre
hospitalo-universitaire de Tlemcen**

Soutenu le : Juillet 2021

Devant le Jury :

Président :	Mr. MKEDDER Ilham	Maitre de conférences classe B	U. de Tlemcen
Examineur :	Mr. BOUALI Wafaa	Maitre de conférences classe A	U. de Tlemcen
Encadreur :	Mr. REBIAHI Sid Ahmed	Professeur	U. de Tlemcen

Année universitaire : 2020 - 2021

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu ALLAH, le tout puissant, de nous avoir donné la force, la patience et le courage durant tout notre cursus universitaire, grâce à ALLAH nous avons sur monter toutes les difficultés et arriver à ce succès.

Nous remercions, en second lieu toutes les personnes qui ont contribué à l'accomplissement de cette mémoire.

Notre grande gratitude à notre encadreur Mr. REBIAHI Sid Ahmed nous tenons à le remercier pour son soutien, sa disponibilité et ses conseils pour la réalisation et la finalisation de cette mémoire.

L'expression de nos vifs remerciements aux membres du jury pour bien vouloir accepter d'évaluer ce travail.

Et enfin nous adressons nos remerciements à nos parents, à nos proches et à nos amis (es).

Merci à toutes et à tous.

Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire à

*Mes chers parents, que je ne je ne cesserai jamais à les
remercier pour leurs sacrifices depuis toujours, pour leurs
soutenances et leurs aides, leurs précieux conseils et leurs
présences à mes côtés, et de m'avoir toujours poussé pour aller
en avant.*

*A mon cher époux et ma petite princesse Lilya, d'être toujours
là pour m'épauler et me porter aide et appui.*

*A mes chères sœurs et frères qui m'ont toujours soutenue et
encouragée.*

*A mes amis, ceux qui ont pris le temps de m'aider et de
m'encourager tout au long de cette mémoire, et surtout ma
chère ZIANI CHERIF Manal.*

Et à tous mes camarades de promotion.

BENOSMAN Manel.

Dédicace

Pour être reconnaissant envers ceux qui nous ont Soutenus et encouragés à faire ce travail de recherche, je dédie ce mémoire

A mes très chers et adorables parents :

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous mérites pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge d'adulte.

Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à vous. Que dieu vous donne longue vie et vous protège pour moi.

A mon frère Mehdi :

Je te remercie pour tous, que dieu vous préserve pour moi.

Je te souhaite une longue vie pleine de succès, de santé et de joie.

*A mon amie, binôme, collègue, partenaire dans tout
BENOSMAN Manel*

Je te souhaite tout ce que tu veux avec une vie pleine de la joie et de succès. A toutes les personnes m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.

ZIANI CHERIF Manal

ملخص

يمثل ظهور وانتشار مقاومة المضادات الحيوية تهديداً كبيراً للصحة العامة في البلدان المتقدمة والبلدان النامية على الصعيد العالمي ، والسبب الرئيسي لظهور هذه المقاومة هو الاستهلاك المتهور للمضادات الحيوية. التحقيق في تأثير المضادات الحيوية التي سبق إعطاؤها على ملف حساسية المضادات الحيوية من Enterobacter العوامل التي تؤثر على الوفيات. السلالات هي تلك التي يكون CMI المقاس فيها أكبر من التركيز الحرج المنخفض وأقل من أو يساوي التركيز الحرج العالي. فقط عندما تتركز جرعة عالية من العلاج الجهازى أو المضادات الحيوية في موقع الإصابة ، فإن احتمالية نجاح العلاج ستكون عالية.

Résumé

L'apparition et la propagation de la résistance aux antibiotiques constitue une menace majeure pour la santé publique des pays développés et non développés à l'échelle mondiale, la principale raison de l'émergence d'une telle résistance est la consommation imprudente d'antibiotiques.

L'étude de l'effet des antibiotiques précédemment administrés sur le profil de sensibilité aux antibiotiques d'Enterobacter, les facteurs affectant la mortalité.

Les souches sont celles dont la CMI mesurée est supérieure à la concentration critique faible et inférieure ou égal à la concentration critique élevée. Ce n'est que lorsque la thérapie systémique à haute dose ou les antibiotiques sont concentrés sur le site de l'infection que la probabilité de succès du traitement sera élevée.

Abstract

The emergence and spread of antibiotic resistance is a major threat to public health in developed countries and developing ones globally, the main reason for the emergence of such resistance is the reckless consumption of antibiotics.

Investigating the effect of previously administered antibiotics on the antibiotic susceptibility profile of Enterobacter, factors affecting mortality.

Strains are those whose measured MIC is greater than the low critical concentration and less than or equal to the high critical concentration. It is only when high dose systemic therapy or antibiotics are concentrated at the site of infection that the likelihood of successful treatment will be high.

Liste des figures

Figure 1 : Détermination de la CMI.....	4
Figure 2 : Mécanisme d'intégration des cassettes.....	8
Figure 3 : Structure d'une cassette.....	8
Figure 4 : Sélection de mutants résistants en fonction de la concentration en antibiotique	9
Figure 6 : Structure de base des bêta-lactamines	10
Figure 7 : Structure de base de céphalosporine	12
Figure 8 : Structure d'un aminoside.....	13
Figure 9 : Structure de base des quinolones.....	15
Figure 10 : A. <i>E. cloacae</i> ATCC13047 blaKPC-3. B. <i>E. cloacae</i> ATCC13047 bla _{oxa} -48. (Guérin, 2015).....	26

Liste des tableaux

Tableau 1 : Préparation des solutions mères d'antibiotiques pour la détermination de CMI en milieu liquide	21
Tableau 2 : Distribution des CMI (CMI50/CMI90) de 28 antibiotiques déterminées pour des isolats cliniques d'ECC	25

Liste des abréviations

AAC :Aminoglycosideacétyltransférase.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AME :enzyme modifiant les aminoside.

AmpC : bêta- lactamase chromosomique.

ANT : o-nucléotide transférase.

APH :o-phospho transférase.

ARNm :acide ribonucléique messenger.

ARNt : acide ribonucléique de transfert.

BLSE :Béta Lactamase à Spectre Elargie.

C1G :céphalosporine de première génération.

C3G :céphalosporine de troisième génération.

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMI :concentration minimale inhibitrice.

CO2 :le dioxyde de carbone.

CPM :concentration de mutation préventive.

ECC :Enterobacter Cloacae Complex.

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GBN : bacille gram négatif.

MH : Mueller-Hinton.

MGE : éléments génétique mobile.

PED : pays en développement.

PLP : proteine de liaison à la pénécilline.

RAM : augmentation de la résistance aux antimicrobiens.

Spp : speciespluralis.

β -NAD :béta nictinamide adénine nucléotide.

Mg : milligramme.

L : litre.

\leq : inférieur ou égal à.

\geq :supérieur ou égal à.

Table des matières

Introduction.....	2
Synthèse Bibliographique	4
1. Définition de la résistance	4
1-2 La résistance acquise ou secondaire	6
1-3 Les voies de la résistance acquise.....	7
1-3 Les intégrons en tant que support génétique	7
2. Définition d'un antibiotique	10
2-1 Les β -lactamines	10
2-1-1 Définition	10
2-1-2 Mécanisme de résistance des β -lactamines	11
2-1-3 Différents mécanismes de résistances aux β -lactamines.....	11
2-3 les céphalosrinases.....	12
2-3-1 Définition	12
2-3-2 Différents mécanismes de résistances	12
2-4 Les aminosides	13
2-4-1 Définition	13
2-4-2 Mécanisme d'action	13
2-4-3 Différents mécanismes de résistances	14
2-5 Les quinolones.....	14
2-5-1 Définition	14
2-5-2 Mécanisme d'action	15
3. Les bacilles à Gram négatif	15
3-2 Entérobacter spp	16
3-2-1 Mécanismes de résistances aux β -lactamines chez les <i>Enterobacter spp</i>	16

3-3 <i>Enterobacter cloacae</i>	17
Matériel et méthodes.....	19
Technique 1.....	19
Technique 2.....	20
Technique3.....	21
Résultats.....	23
Technique 1.....	24
Technique 2.....	25
Technique 3.....	26
Discussion.....	28
Conclusion.....	30
Bibliographie.....	31

Introduction

Introduction

Aujourd'hui, la résistance bactérienne aux antibiotiques reste un problème majeur de santé publique. La situation à l'hôpital semble particulièrement préoccupante. La pression de sélection exercée par l'utilisation généralisée des antibiotiques et la propagation des souches pharmaco résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (**Soussy, 2007**). L'augmentation de la résistance aux antimicrobiens (RAM) entraîne une augmentation de la morbidité, de la mortalité et des coûts de santé (**Coastet al .,1996**).

La multirésistance observée chez certains pathogènes est autrement critique. Elle réduit grandement et parfois élimine entièrement l'arsenal thérapeutique efficace contre les infections causées par ces pathogènes avec comme conséquence un impact négatif sur les résultats cliniques. Les souches hautement résistantes appartiennent aux bactéries de la famille des entérobactéries (**Laupland et al., 2005 ; Mataseje et al., 2009-10**).

La résistance aux antimicrobiens se produit lorsque des micro-organismes (bactéries, champignons, parasites et virus) acquièrent une résistance à un médicament antimicrobien auquel ils étaient auparavant sensibles. La résistance aux antimicrobiens d'un large éventail d'agents infectieux est devenu extrêmement préoccupante pour les pays et de nombreux secteurs d'activité. Il est particulièrement alarmant de constater la propagation rapide, dans le monde entier, de bactéries multi-résistantes provoquant des infections courantes qui ne sont pas sensibles au traitement par les antimicrobiens existants (**Patricia, 2001**).

Parmi les antimicrobiens figurent antibiotiques, des antiviraux, des antifongiques et des antiparasitaires. Nous nous intéresserons en particulier à la résistance aux antibiotiques (**Fosseprez, 2013**).

Synthèse
Bibliographique

Synthèse Bibliographique

1. Définition de la résistance

La « résistance » est la capacité des bactéries à se répliquer, et pas seulement à survivre en présence de médicaments. La mesure la plus courante des niveaux de résistance est la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui est la concentration minimale requise pour empêcher la réplication d'ADN pour les antibiotiques. Une CMI plus élevée correspond à un niveau de résistance plus élevé. La résistance est héréditaire et peut être obtenue par transfert horizontal de gènes codant pour la résistance par exemple, des enzymes qui inactivent les antibiotiques (**Jacoby, 2009**) ou des pompes à efflux (**Wang et al., 2018**), ou bien des mutations conduisant à une modification de la cible antibiotique qui confèrent le phénotype de résistance à la population bactérienne (**Blair et al., 2015**).

•La concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice ou (CMI) mesure l'effet bactériostatique d'un antibiotique sur une bactérie. Elle correspond à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne visible après 18 h de culture à 35 °C (Figure 1).

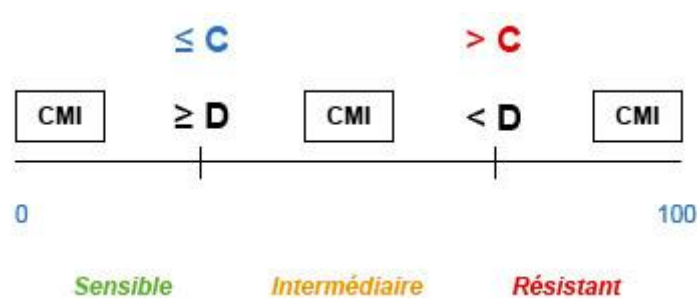


Figure 1: Détermination de la CMI

(<https://www.polycliniques-pau.fr>)

Comparer la CMI avec les concentrations critiques C et c, établies pour chaque antibiotique (C = plus grande) concentration pouvant être obtenue dans le sérum et c = concentration sérique obtenue après injection d'une dose standard. On regarde où se positionne le curseur.

$CMI > C$: bactérie résistante

$CMI < c$: souche sensible

1-1 Résistance innée ou naturelle

La résistance naturelle définit une espèce ou un genre ou un groupe. Lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique.

Il s'agit en fait de bactéries qui sont insensibles au mode d'action de l'antibiotique, c'est un caractère d'espèce. Certaines bactéries sont naturellement résistantes à de nombreuses molécules par production d'une bêta-lactamase de classe A. Il en est de même pour les bactéries anaérobies qui sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies. La résistance innée est observée chez des champignons n'ayant jamais été exposés aux antifongiques (**Ségal et al., 2008**).

C'est un facteur intrinsèque présent chez presque tous les individus d'une même espèce pour un antifongique donné. Elle renvoie à la notion de spectre d'activité d'une molécule (**Andes, 2004**).

1-2 La résistance acquise ou secondaire

La résistance acquise se caractérise par l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques chez certaines bactéries qui étaient auparavant sensibles. La résistance acquise résulte de mécanismes qui sont liés à l'ADN de la bactérie et sont donc caractérisés par des mutations ou des transferts de gènes d'une bactérie résistante vers une bactérie sensible. L'acquisition de gènes de résistance peut résulter du transfert de matériel génétique porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance venant d'une bactérie résistante. Ce deuxième mécanisme est le plus répandu et le plus préoccupant car il peut simultanément concerner plusieurs antibiotiques.

- Échec de pénétration des antibiotiques : diminution de la perméabilité
- Cible de modification : modification du PLPs.
- Excrétion de l'antibiotique : efflux
- Inactivation de l'antibiotique : production de β -lactamase.

La résistance secondaire, apparaît uniquement après exposition du champignon aux antifongiques. Elle ne concerne que quelques isolats minoritaires au sein d'une espèce. La détection d'un isolat résistant chez un patient peut être la conséquence d'un traitement antifongique prolongé ou de l'inhalation d'un isolat résistant présent dans l'environnement. La résistance acquise lors d'un traitement antifongique a des conséquences individuelles, avec peu de conséquences épidémiologiques en l'absence de transmission croisée entre patients. À l'inverse, la résistance acquise dans l'environnement comporte un risque théorique de dissémination (**Snelders et al., 2008**).

1-3 Les voies de la résistance acquise

- Les mutations génétiques chromosomiques entraînent une augmentation de l'expression des mécanismes de résistance intrinsèques (enzymes inactivant les antibiotiques ou pompes à efflux), par la perte de porine de la membrane externe ou des changements de cible, entraînant des changements de perméabilité (**Luyt et al., 2014**).
- Les transferts horizontaux d'éléments génétiques mobiles (MGE) porteurs de gènes de résistance, notamment les bêta-lactamases codant pour le plasmide, les enzymes modifiant les aminosides (AME) ou les mécanismes non enzymatiques tels que Qnr pour la résistance aux fluoroquinolones chez les entérobactéries. Puisque ces plasmides portent généralement plusieurs déterminants de résistance, une seule conjugaison plasmidique peut suffire à conférer un phénotype de résistance multidrogue chez la souche réceptrice (**Bassetti et al., 2015**).

1-3 Les intégrons en tant que support génétique

Les études épidémiologiques ont surtout porté sur la recherche des intégrons de première classe. Différentes études ont montré que ces intégrons étaient très répandus chez différentes bactéries d'origine humaine, animale ou environnementale. Ces intégrons ont été décrits chez les entérobactéries et autres bactéries à Gram négatif (**Ploy et al., 2003 ; Soto et al., 2003**).

L'intégron est une structure immobile, portée par des plasmides, des transposons ou plus rarement sur le chromosome des bactéries (**Ploy et al., 2000**). La plateforme fonctionnelle d'un intégron est constituée d'un gène *intI*, codant une intégrase, du site *attI*, qui est un site spécifique de recombinaison et d'un promoteur *P_c* (Figure 2) (**Rowe-Magnus et al., 2002**).

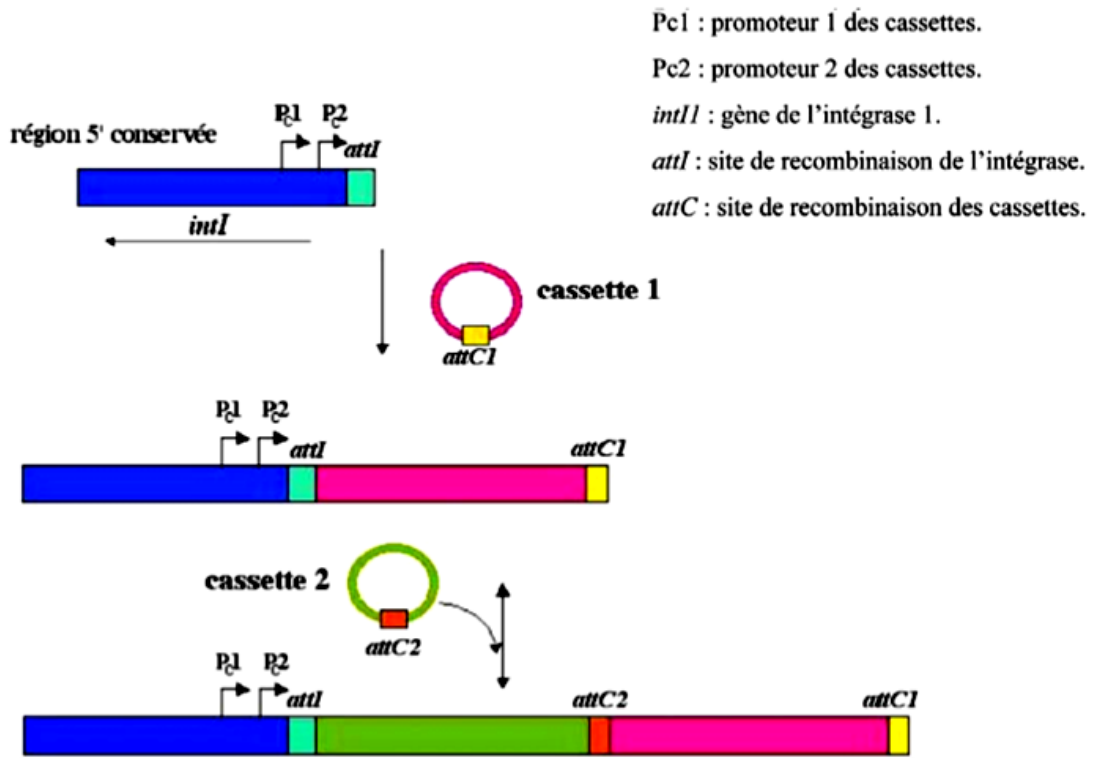


Figure 2 : Mécanisme d'intégration des cassettes.

(Ploy *et al.*, 2005)

L'intégration des cassettes 1 et 2 se fait préférentiellement au site de recombinaison *attI* situé dans la région 5'. Différentes cassettes peuvent être intégrées, chacune possédant un site *attC* unique. L'excision de la cassette 2 se fait sous forme circulaire et a lieu par recombinaison entre le site *attC1* et le site *attC2* (Ploy *et al.*, 2005).

Les cassettes forment un groupe varié de petits éléments mobiles non répliatifs. Ce sont des unités fonctionnelles indépendantes qui peuvent être mobilisées de manière individuelle. Les cassettes existent sous forme circularisée ou intégrée (figure 3) (Collis *et al.*, 1992).



Figure 3 : Structure d'une cassette

(Ploy *et al.*, 2005)

Synthèse Bibliographique

La population bactérienne comprend de rares mutants résistants qui existaient avant le traitement. Lors de la prise d'un antibiotique, il est possible de suivre l'évolution de la concentration sérique (sanguine) de celui-ci. Dans tous les cas, une augmentation rapide de la concentration sérique d'antibiotiques a été observée après la prise, ce qui traduit l'entrée de molécules du système digestif dans le système circulatoire. Ensuite, à mesure que les antibiotiques se dégradent, en particulier la dégradation hépatique, la concentration sérique diminue. (Cantón *et al.*, 2013).

Si la concentration sérique de l'antibiotique reste inférieure à la CMI, elle n'a aucun effet sur l'ensemble de la population bactérienne. Si la concentration sérique atteint un niveau compris entre la CMI et la concentration de mutation préventive de résistance (CPM), les rares bactéries résistantes aux médicaments (sous-groupes) qui existent peuvent persister et se multiplier. Par conséquent, il est important d'obtenir une concentration sérique maximale (C_{max}) supérieure à la CPM et d'éviter le plus longtemps possible la fenêtre de sélection des mutants résistants (Cantón *et al.*, 2013).

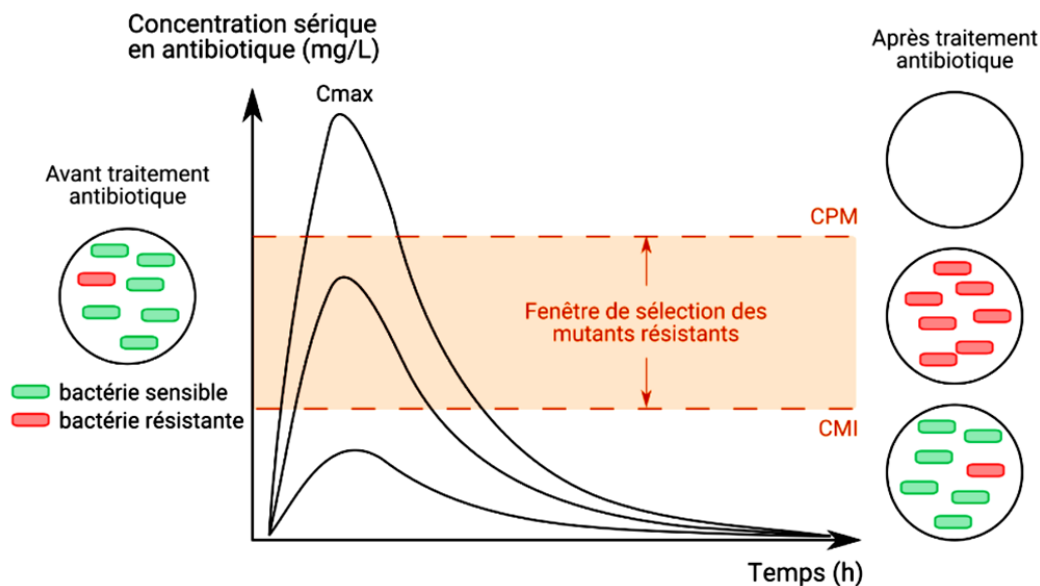


Figure 4 : Sélection de mutants résistants en fonction de la concentration en antibiotique

(Cantón *et al.*, 2013)

2. Définition d'un antibiotique

Les antibiotiques sont une des avancées médicales les plus importantes du XXe siècle. Leur implication dans l'allongement de l'espérance de vie et l'amélioration de l'état de santé de la population va bien au-delà de leur utilisation dans le traitement des infections communautaires, puisqu'ils ont été des acteurs incontournables des progrès de la chirurgie et de l'onco-hématologie. Dès les premiers temps de l'utilisation des antibiotiques, il a été évident que certaines bactéries y étaient naturellement résistantes, et que les bactéries sensibles pouvaient également acquérir cette résistance (Cassini, 2019).

Les antibactériens traitent les maladies causées par des bactéries et ne peuvent pas traiter les infections virales (Felman, 2019).

2-1 Les β -lactamines

2-1-1 Définition

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en pratique clinique (Zogheib et al., 2005 ; Villalobos et al., 2006), notamment dans le traitement des infections à entérobactéries. La famille des lactames comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence de cycles β -lactames (figure 5).

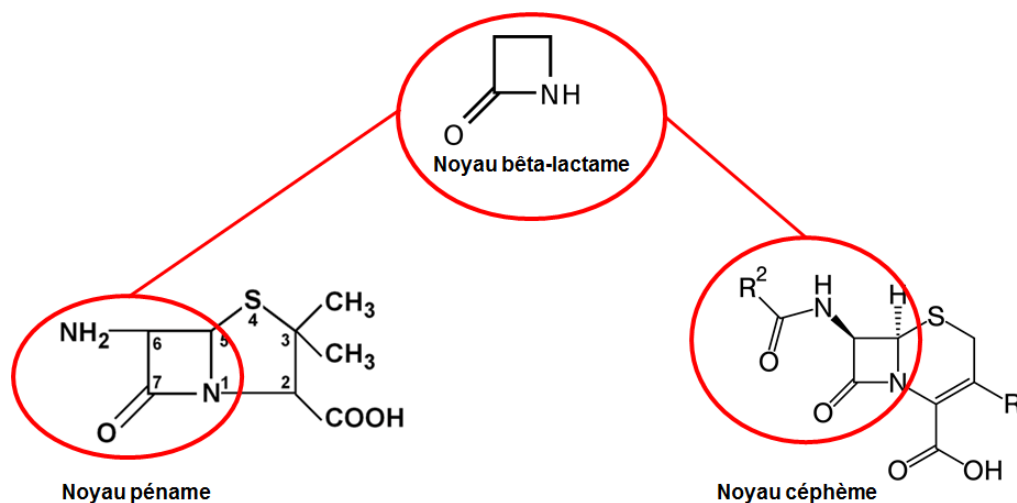


Figure 5 : Structure de base des bêta-lactamines

(Villalobos et al., 2006)

2-1-2 Mécanisme de résistance des β -lactamines

La production de β -lactamase est le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries à l'activité des antibiotiques. La faible toxicité est liée au mode d'action très complexe sur les protéines de la membrane plasmique cellulaire, appelée protéine de liaison à la pénicilline (PLP) (Cavallo et al., 2004).

2-1-3 Différents mécanismes de résistances aux β -lactamines

Il existe quatre principaux mécanismes de résistance, chacun pouvant être associé aux caractéristiques génétiques d'une espèce bactérienne donnée.

2-2 Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes :

Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines et ayant un spectre d'activité plus large. Elles sont actives sur la plupart des bacilles à Gram négatif, notamment les entérobactéries. Les carbapénèmes ont un usage exclusivement hospitalier et sont prescrits dans le traitement des infections à bactéries multirésistantes. La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries s'explique soit par un défaut de perméabilité membranaire soit principalement par inactivation enzymatique de l'antibiotique suite à la production de carbapénémases (Nordmann, 2010).

2-3 les céphalosrinases

2-3-1 Définition

Les céphalosporines sont des molécules de prescription largement utilisées, que ce soit en milieu hospitalier ou en médecine urbaine (**Figure 6**).

Un noyau commun,

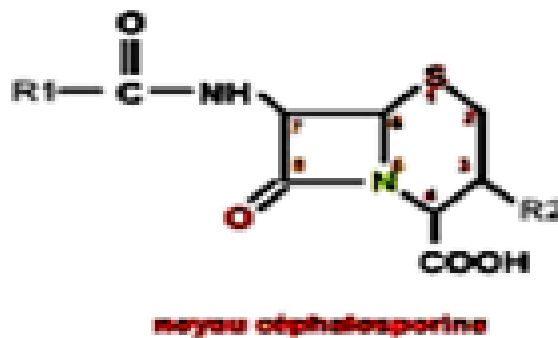


Figure 6 : Structure de base de céphalosporine

(<https://slidetodoc.com>)

Leur pharmacocinétique est favorable et leur champ d'action couvre la plupart des bactéries d'intérêt médical. Cependant, cette dernière diffère d'une génération à l'autre et s'étend aux bacilles à Gram négatif (**Bush, 2001**). Les Céphalosporinases prennent de plus en plus d'importance chez les **entérobactéries (Jacoby, 2009)**.

2-3-2 Différents mécanismes de résistances

Avec la popularité des BLSE et des céphalosporinases plasmidiques, la consommation de carbapénèmes a également augmenté. La diffusion des carbapénémases d'origine plasmidiques a favorisé l'émergence des CRE. Les antécédents médicaux doivent être similaires à ceux de la BLSE-PE, *Enterobacter* affecte l'environnement hospitalier et s'accompagne d'épidémies locales (**Bratu et al., 2005**). La propagation des enterobacter résistants aux carbapénèmes : une nouvelle menace pour nos armements antibiotiques. (**Souli et al., 2010**).

2-4 Les aminosides

2-4-1 Définition

Les aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques. Leur structure de base commune comporte un aminocyclitol (cycle à 6 chaînons avec des groupements aminés), auquel se lient par des ponts glycosidiques 2 ou exceptionnellement 3 dans la néomycine hexoses (figure 7) (Poole, 2004).

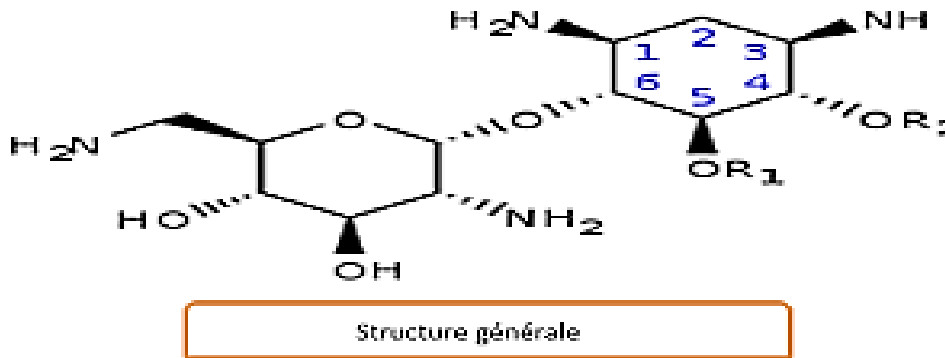


Figure 7 : Structure d'un aminoside

(Poole, 2004)

2-4-2 Mécanisme d'action

Les aminosides agissent au niveau des ribosomes bactériens et perturbent la synthèse des protéines (Scholar, 2008) La pénétration des aminosides à l'intérieur des bactéries se fait en trois étapes :

- La première étape est un canal passif, permettant à la porine de traverser la membrane externe pour Gram négatif, puis à travers le peptidoglycane (Gram + et -). Ensuite, les aminosides sont concentrés sur la membrane plasmique cellulaire (Changer, 2009).

- La deuxième étape a besoin de transférer l'énergie métabolique à travers le gradient entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cette étape peut être bloquée par des mutations. Il peut également être perturbé si des conditions strictes pour le transport de l'énergie oxydante sont générées. Ceci explique la sensibilité réduite des bactéries anaérobies aux aminosides, et l'activité réduite des aminosides contre les anaérobies facultatifs (**Enterobacter**).
- La troisième étape est la plus rapide, les aminosides se fixent sur le ribosome et provoquent la fixation d'un ARNt incorrect sur l'ARNm, ce qui perturbe la reconnaissance codon-anticodon et induit la synthèse de protéines erronées (**Bryskier et al., 1999**).

2-4-3 Différents mécanismes de résistances

Le mécanisme principal de la résistance aux antibiotiques aminosides repose sur la modification enzymatique de certains groupes chimiques de ces antibiotiques. Trois types d'enzymes sont décrits: la N-aminoacétyltransférase (AAC), la O-phosphotransférase (APH) et la O-nucléotide transférase (ANT) réalisent la phosphorylation de la fonction OH. La modification de l'AAC a amené l'espèce à développer une résistance à la plupart des aminosides utilisés en thérapie (gentamicine, tobramycine, nétilmicine et amikacine) (**Kettner, 1995**).

2-5 Les quinolones

2-5-1 Définition

Les quinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique, qui sont dérivées de divers acides carboxyliques hétérocycliques substitués. Toutes les quinolones actuelles ont une structure bicyclique, avec de l'azote en position 1, un carboxyle en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones contiennent un atome de fluor en position 6, sont dérivées des quinoléines (**figure 8**) (**Thomas, 2006**).

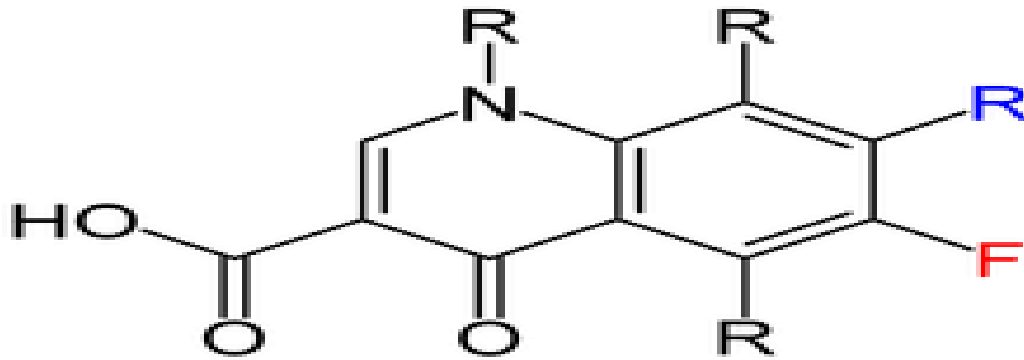


Figure 8 : Structure de base des quinolones

(<https://www.techno-science.net>)

2-5-2 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de cette catégorie pharmacologique comprend l'inhibition de l'ADN gyrase, de la topo isomérase II bactérienne et de la topo isomérase IV constituée de deux sous-unités A et de deux sous-unités B. Ces enzymes sont essentielles à la réplication et à la transcription de l'ADN bactérien ; l'inhibition des complexes ADN bactérien/enzyme par les quinolones peut empêcher le « super enroulement », le relâchement de l'ADN « enroulé » et la séparation en double hélice de l'ADN. Les quinolones sont spécifiques de l'ADN bactérien et exercent une activité bactéricide lors de la propagation et du stade quiescent des bactéries (Larouche, 2001).

3. Les bacilles à Gram négatif

3-1 Définition :

Certains bacilles à Gram négatif (BGN). Ce sont des bactéries fréquemment trouvées en clinique, tant au niveau des flores normales qu'en tant qu'agent pathogène dans une variété d'infections. Avec l'utilisation des antibiotiques, différents mécanismes de résistance sont apparus et plusieurs bactéries sont maintenant résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques (Yong, 2009 ; El Fertas Aissani, 2012).

3-2 Entérobacter spp

Au cours des dernières décennies, les Enterobacter spp. ont pris une importance clinique et ont émergé comme agents pathogènes nosocomiaux chez les patients en soins intensifs. Généralement, Les Enterobacter sont des bacilles à Gram négatif mobiles, fermentent ou non le lactose et ils ont une bêta-galactosidase (**Sanders, 1997**).

La monothérapie a été définie comme l'utilisation d'un seul antibiotique auquel l'Enterobacter sp. était sensible in vitro pendant plus de 24 heures dans les 5 jours suivant l'hémoculture positive (**Fauchère, 2002**).

3-2-1 Mécanismes de résistances aux β -lactamines chez les *Enterobacter spp*

La production de bêta-lactamase est le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries (**Ambler, 1980**). Ces enzymes hautement diversifiées hydrolysent les bêta-lactamines dans l'espace périplasmique, empêchant ainsi l'inhibition des protéines de liaison à la pénicilline.

Les Entérobactéries sont généralement classées en fonction de leur teneur intrinsèque en bêta-lactamase. Un phénotype particulier est observé chez les espèces qui produisent une céphalosporinase AmpC inducible codée par chromosome, notamment Enterobacter sp (**Jacoby, 2009**).

AmpC est fortement induit par amoxicilline, acide clavulanique, céfoxitine et céphalosporines de première génération (1GC), qui se traduit par la résistance. Les carbapénèmes sont également de puissants inducteurs, mais restent actifs en raison du manque de l'hydrolyse, tandis que les autres bêta-lactamines sont des inducteurs plus faibles. Les producteurs doivent être de préférence traités par la ticarcilline ou pipéracilline: la 3GC, lorsqu'elle est active, doit être évitée en raison d'un risque plus élevé de sélection de mutants résistants et un impact écologique plus important (**Harris et al., 2012 ; Leclercq et al., 2013**).

3-3 *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae est un bacille à Gram négatif qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Enterobacter* a été créé en 1960 (**Hormaeche, 1960**). Il est mobile grâce à des flagelles répartis sur toute la surface. Ils peuvent aussi émettre à leur surface des appendices différentes des flagelles (**Danielle, 2011**). L'*Enterobacter cloacae* complex (ECC) peut être retrouvé au niveau du sol, de l'eau, des plantes et des animaux (**Halda-Alija et al., 2001 ; Araujoont et al., 2002**).

Les espèces du complexe *Enterobacter cloacae* (ECC) sont opportunistes et peuvent provoquer des infections des voies respiratoires inférieures et des bactériémies (**Paauw et al., 2008 ; Streit et al., 2004**). Ces bactéries sont également connues pour provoquer des infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs. Il a également été rapporté que le tractus gastro-intestinal humain est le réservoir endogène le plus courant pour ces bactéries (**Ren et al., 2010**).

Plus récemment, il a été noté que les bactéries ECC constituent une menace pour les plantes en provoquant la pourriture interne de l'oignon et la maladie du jaunissement des graines de papaye (**Garcia et al., 2018**).

Des études antérieures ont rapporté que les souches ECC possèdent divers facteurs de virulence potentiels, tels que des systèmes de sécrétion et des systèmes d'efflux de résistance aux médicaments multiple. Est le plus récemment découvert et largement distribué chez les bactéries à Gram négatif.

Les grappes génétiques comprennent un groupe de gènes étroitement regroupés ; parmi ceux-ci, 13 gènes conservés sont les composants de base codés par des bactéries pathogènes et non pathogènes (**Harada et al., 2017**).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Technique 1

L'identification des espèces appartenant au genre *Enterobacter* est simple, que ce soit dans le cadre de prélèvements à visée diagnostique ou épidémiologique.

L'isolement de la bactérie se fait à partir de prélèvements d'origine diverses (sang, tractus respiratoire, cavité intra-abdominale, urines, matériel. . .).

La culture d'*Enterobacter cloacae* complex (ECC) ne pose généralement pas de problème en raison de l'absence d'exigence particulière. Les colonies apparaissent sur géloses ordinaires après 18 heures d'incubation à 35°C. (**Mezzatesta et al., 2012**).

L'identification peut être réalisée à l'aide de techniques conventionnelles par détermination des caractères biochimiques et la fermentation des sucres. L'utilisation de tests complémentaires permet d'améliorer le pouvoir discriminant des galeries de première intention (**Mezzatesta et al., 2012**).

Technique 2

Diffusion en gélose :

Milieux : Gélose Mueller-Hinton (MH) et gélose MH au sang de cheval défibriné et additionnée de β -NAD (**MH-F**).

La gélose MH est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries autres que celles à croissance lente.

La gélose MH-F additionnée de 5% de sang de cheval défibriné et de 20 mg/L de β -NAD, est employée pour *Streptococcus spp.* dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella sp.*, *Corynebacterium* et autres bactéries à croissance lente (**EUCAST, 2020**).

Il est à noter que les essais de la CMI en bouillon sont reproductibles à plus ou moins une dilution. Les essais sont réalisés sur des plaques de microdilution à 96 puits. La méthode est basée sur la préparation de solutions des antibiotiques pour un volume total de 200 μ L dans la cupule, c'est-à-dire, 100 μ L d'antibiotique et 100 μ L de suspension bactérienne. La norme fait référence à des volumes totaux de 100 μ L, mais par souci de risque de dessèchement de la cupule, ils ont préféré doubler le volume. Il faut utiliser un bouillon Mueller-Hinton (MH) pour les dilutions d'antibiotiques et les suspensions (**EUCAST, 2020**).

Préparation des solutions d'antibiotiques

Préparer 30 mL de solution d'antibiotique à 512 mg/L. Pour cette fin, dissoudre préalablement les antibiotiques dans de l'eau stérile. (Tableau 01). A partir des solutions mères de ces antibiotiques dans l'eau.

Tableau 1 : Préparation des solutions mères d'antibiotiques pour la détermination de CMI en milieu liquide (**EUCAST 2020**).

Antibiotique	Degré de pureté (%)	Pesée (mg)	Eau stérile (ml)
Fosfomycine	74,72	102,8	10
Lincomycine	91,8	83,65	10

Technique3

- La CMI de différents antibiotiques obtenus par les systèmes—(Vitek®, MicroScanWalk-Away®, Phoenix™)
- Les Diamètres des zones d'inhibition autour de disques d'antibiotiques diffusant sur milieu gélosé : carbapénèmes (ertapénème, méropénème, imipénème), éventuellement témocilline et faropénème

Résultats

Résultats

Technique : L'émergence de la résistance aux antibiotiques engendre de graves conséquences sanitaires et économiques (Kollef., 2005). Elle est responsable d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et conduit à utiliser des médicaments plus onéreux et souvent plus toxiques. La conséquence sur le plan économique est une augmentation des coûts des soins de santé. Une étude cas-témoins sur la résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) chez des espèces d'*Enterobacter* a démontré que l'émergence de la résistance était associée à une augmentation de la mortalité (risque relatif : 5,02; $p = 0,01$) à la durée d'hospitalisation (1,5 fois, $p < 0,001$) et aux coûts hospitaliers (1,5 fois, $p < 0,001$).

Par ailleurs, ces longues hospitalisations entraînent une diminution de l'efficacité. Un plan de lutte efficace contre la résistance aux antibiotiques s'impose s'appuyant sur des approches multidisciplinaires et complémentaires (Cosgrove *et al.*, 2002).

La consommation judicieuse des antibiotiques : Pour prévenir la résistance, il faut des antibiotiques qui se définissent par le choix de l'antibiotique optimal vis-à-vis du micro-organisme visé, de la dose, du rythme d'administration et de la durée du traitement ayant pour objectif final une évolution clinique satisfaisante en terme de thérapie ou de prévention. Les molécules de faible toxicité et ayant un risque limité d'entraîner des résistances doivent bien sûr être très privilégiées.

En Afrique de l'Ouest, cette utilisation avisée des antibiotiques implique une double action : la formation des prescripteurs et la mise en place de techniques et évaluation de sa sensibilité aux antimicrobiens (Gerding *et al.*, 1991).

La surveillance de la résistance, les deux déterminants de l'émergence et de la diffusion de la résistance bactérienne aux antibiotiques sont : l'exposition de la population aux antibiotiques et la transmission par l'environnement de souches résistantes. La surveillance est essentielle pour connaître l'ampleur du problème et surveiller l'impact des programmes de lutte contre la résistance.

Technique 1

Un des facteurs de risque d'infections dues à l'ECC est l'allongement de la durée de séjour en milieu de soins et plus particulièrement en soins intensifs (**Burchard et al., 1986 ; Flynn et al., 1987**).

Les pathologies sous-jacentes (diabète, cancer, brûlures. . .), les dispositifs médicaux (cathéter, sonde urinaire, sonde endotrachéale. . .) et l'immunodépression constituent également des facteurs de risque d'infection (**Burchard et al., 1986 ; Gallagher, 1990**).

En néonatalogie, la prématurité et les nouveau-nés de faible poids ainsi que les dispositifs médicaux sont associés à une augmentation des risques d'infections à l'ECC (**Gallagher, 1990**). En 2013, **Chang et al.** ont rapporté une épidémie à ECC résistante à l'ertapénème avec pour origine un urétroscope.

Dans les unités de néonatalogie, l'émergence de souches appartenant à l'ECC ont été impliquées dans des infections sévères et dans la colonisation de nouveau-nés (**Chang et al., 2013**).

Technique 2

Les souches sauvages d'ECC sont aussi naturellement sensibles aux autres classes d'antibiotiques : aminosides, quinolones, triméthoprime, sulfamides, tétracyclines et chloramphénicol. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (CMI₅₀ et CMI₉₀) déterminées à partir des données EUCAST 2014, sont représentées dans le (Tableau 2).

Tableau 2 : Distribution des CMI (CMI₅₀/CMI₉₀) de 28 antibiotiques déterminées pour des isolats cliniques d'ECC

(Données EUCAST 2014).

Antibiotique	CMI (mg/L)			Valeurs critiques (mg/L)		Nombre de souches
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Range	EUCAST ^a	CASFM ^b	
Ampicilline	256	> 256	1– > 256	NA	≤ 8	824
Ticarilline	16	256	1–256	NA	≤ 8– > 16	5758
Pipéracilline	4	256	0,12– > 256	NA	≤ 8– > 16	3555
Ticarilline-acide clavulanique	8	256	1–256	NA	≤ 8– > 16	10,580
Pipéracilline-tazobactam	2	128	0,01– > 256	≤ 8	≤ 8– > 16	12,370
Céfalotine	256	> 256	2– > 256	NA	NA	188
Céfoxitine	64	> 256	4–256	NA	≤ 8– > 16	7244
Ceftriaxone	2	256	0,06–256	≤ 0,5	≤ 1– > 2	153
Ceftazidime	0,5	256	< 0,016– > 256	≤ 1	≤ 1– > 4	3801
Céfotaxime	0,12	256	< 0,01– > 256	≤ 0,5	≤ 1– > 2	1073
Céfépime	≤ 0,12	8	0,01– > 256	≤ 0,12	≤ 1– > 4	6284
Aztréonam	0,25	64	0,03–128	NA	≤ 1 > 4	245
Imipénème	0,5	2	< 0,01–64	≤ 1	≤ 2– > 8	12,051
Ertapénème	0,06	1	< 0,01–16	≤ 0,06	≤ 0,5– > 1	1179
Méropénème	0,06	0,125	< 0,01–64	≤ 0,12	≤ 2– > 8	8172
Tobramycine	0,5	4	0,06– > 256	≤ 2	≤ 2– > 4	8039
Gentamicine	0,5	2	< 0,01– > 256	≤ 2	≤ 2– > 4	7683
Amikacine	1	8	0,25–64	≤ 8	≤ 8– > 16	5657
Acide nalidixique	2	256	1–256	NA	NA	234
Ciprofloxacine	0,01	1	< 0,01– > 256	≤ 0,125	≤ 0,5– > 1	2354
Lévofloxacine	0,06	4	0,01–128	NA	≤ 1– > 2	1034
Moxifloxacine	0,06	4	0,03–128	≤ 0,25	≤ 0,5– > 1	1034
Tétracycline	4	16	0,5–256	≤ 16	NA	1099
Minocycline	4	16	0,5–64	≤ 16	NA	799
Tigécycline	0,5	1	0,12–16	≤ 2	≤ 1– > 2	894
Cotrimoxazole	0,12	4	0,03–256	≤ 1	≤ 2– > 4	2893
Chloramphénicol	8	16	2–256	NA	≤ 8	110
Colistine	0,5	16	0,06– > 256	≤ 2	≤ 2	996

En pratique courante, toute souche clinique présentant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes (Fig. 9) selon les recommandations du CASFM 2014, nécessite la recherche d'une carbapénémase (Stock *et al.*, 2001).

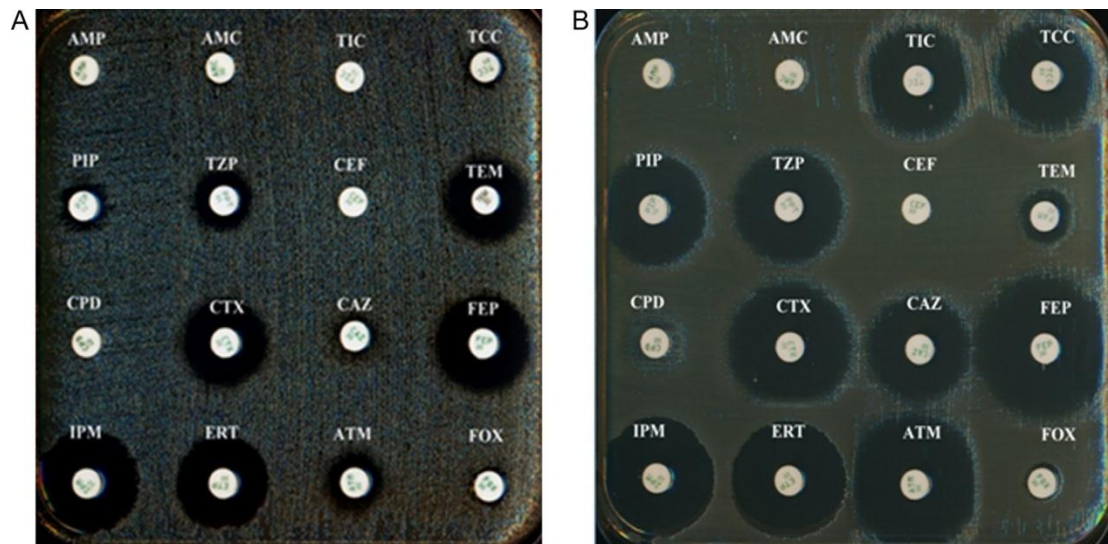


Figure 9 :A. *E. cloacae* ATCC13047 blaKPC-3. B. *E. cloacae* ATCC13047 blaOXA-48. (Guérin, 2015)

AMP : ampicilline; AMC : amoxicilline-acide clavulanique ; TIC : ticarciline ; TCC : ticarcilline-acideclavulanique ; PIP : pipéracilline ; TZP : pipéracilline-tazobactam ; CEF : céfalotine ; TEM : témocilline ; CPD : céfamandole ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ; IPM : imipénème ; ERT : ertapénème ; AZT : aztréonam ; FOX : céfoxitine.

Technique 3

Elle consiste grâce au dépistage des patients et du personnel colonisés ou infectés, à réduire la transmission des microorganismes résistants d'une personne à une autre par des mesures d'isolement et/ou d'hygiène dont le lavage des mains, le port de gants, de masques et de blouses. L'identification précoce permet de réduire la diffusion de la résistance à plus grande échelle à travers la communication entre les établissements de soins lors du transfert de patient d'une structure à une autre et la mise en place rapide de stratégies thérapeutiques rapides.

Discussion

Discussion

Les souches sauvages d'ECC sont aussi naturellement sensibles aux autres classes d'antibiotiques : aminosides, quinolones, triméthoprime, sulfamides, tétracyclines et chloramphénicol (**Stock et al., 2001**). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (CMI 50 et CMI90) déterminées à partir des données EUCAST 2014, sont représentées dans le (Tableau 2).

Une souche d'ECC présentant une délétion de 6 acides aminées dans la boucle H-10 d'AmpC ayant pour conséquence une augmentation des CMI du céfépime ($CMI \geq 128$ mg/L pour une CMI de base $\leq 0,12$ mg/L), probablement liée aussi à des mutations au niveau des gènes ampD et ampR. (**Barnaud et al., 2001**). Le pourcentage de souches cliniques appartenant à l'ECC résistantes aux C3G varie entre 20 % et 30 % (**Paterson, 2006**).

La mauvaise utilisation des antibiotiques, leur usage abusif voire inapproprié les niveaux d'activité trop faibles pour certains antibiotiques de mauvaise qualité ou mal conservés augmentent considérablement la probabilité qu'une bactérie ou autres microorganismes soient sélectionnés et deviennent résistants aux antibiotiques à large spectre au niveau des structures hospitalières (**Gerding et al., 1991 ; Paterson, 2006**).

Conclusion

Conclusion

Les bactéries ont récemment développé une résistance à tous les types d'antibiotiques actuellement utilisés, ce qui pose parfois des problèmes de traitement majeurs, comme les entérobactéries. Les stratégies semblent présenter un intérêt pour l'avenir de l'antibiothérapie basée sur des études in vitro et in vivo et le développement de nouvelles classes d'antibiotiques. La tolérance d'Enterobacter aux biocides est préoccupante. La résistance aux fongicides peut être l'un des facteurs co-sélectifs de la résistance aux antibiotiques et des souches résistantes aux antibiotiques persistant dans les hôpitaux. Les résultats soulignent la nécessité de développer de nouvelles stratégies et d'explorer d'autres méthodes alternatives pour lutter contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. L'ECC semble être un agent émergent responsable d'infections liées aux soins, plus particulièrement dans les unités de réanimation.

Les méthodes d'intervention doivent être intégrées et cibler simultanément les décideurs, les prescripteurs et les utilisateurs.

La problématique actuelle est l'émergence de souches d'Entérobactéries productrices de Carbapénémases (EPC) pour lesquelles l'arsenal thérapeutique reste très limité.

Bibliographie

1. Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol*, 289:321-331.
2. Bassetti M, D. W.-M. (2015). Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria. *Intensive Care Med*, 41(5):776–795.
3. Blair C, R. C. (2015). Closing the achievement gap through modification of neurocognitive and neuro-endocrine function. *results from a cluster randomized controlled trial of an innovative approach to the education of children in kindergarten. PLOS ONE.*, In press.
4. Bryskier. (1999). Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. *Ed Ellipses*, 747.
5. Bush, K. (2001). New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* , 32:1085-9.
6. Cantón R, H. J. (2013). Inappropriate use of antibiotics in hospitals : the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31 Suppl 4 :3–11.
7. Cavallo J.D., F. R. (2004). Bêtalactamines. EMC-Maladies infectieuses. *EMC-Maladies infectieuses*, 1 : 129-202.
8. Cavallo, J. D.-C. (s.d.).
9. Changeur N., M. C. (2009). Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides). *P:J*.
10. Coast J, S. R. (1996). la résistance aux antimicrobiens.
11. Collis CM, H. R. (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* , 6: 2875–8.
12. EUCAST. (2020). European Committée on Antimicrobial Susceptibility . *Testing*.
13. Fertas-Aissani R., M. Y. (2012). Virulence profils and antibiotic susceptibility patterns of Kiebsiella pneumoniae strains isolated from différent clinical specimens. *Pathologie-Biol*.
14. Fosseppez. (2013). Antibiothérapie en pratique de ville : Constat et réflexions sur le rôle du pharmacien d'officine dans la lutte contre l'antibiorésistance. *Faculté de Pharmacie*.
15. García-Castillo, M. G.-F.-G.-A. (2018). Activity of ceftazidime-avibactam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from urine specimens obtained during the infection-carbapenem resistance evaluation surveillance

- trial (iCREST) in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3), 511–515.
16. Guérin. (2015). Infections à *Enterobacter cloacae* complex : résistance aux antibiotiques et traitement. *Journal des anti-infectieux*.
 17. Harris, P. N. (2012). Antibiotic therapy for inducible AmpC β -lactamase-producing Gram-negative bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(4), 297–305.
 18. Hormaeche E, E. P. (1960). A proposed genus *Enterobacter*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* , 10:71—4.
 19. Jacoby, G. A. (2009). AmpC -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 161–182. doi:10.1128/cmr.00036-08.
 20. Kettner, M. P. (1995). Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates. *Infection* , 23(6): 38383.
 21. Laupland KB, P. J. (2005). Population-based laboratory Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY . Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15.
 22. Leclercq R, O. K. (2013). Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river continuum. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2428–34 .
 23. Luyt CE, B. N. (2014). Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit Care* , 18(5):480.
 24. Mezzatesta ML, G. F. (2012). *Enterobacter cloacae* complexv. *clinical impact and emerging antibiotic resistance*.*Future Microbiol*, 7:887—902.
 25. Paterson. (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobac-teriaceae. *Am J Infect Control*, 20—8.
 26. Ploy MC, C. D. (2003). Integron-associated antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi from Asia. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:1427–9.
 27. Ploy MC, D. F. (2000). Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter Baumannii*. Description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:2684.
 28. Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect*, 10:12-26.
 29. Ren Y, R. Y. (2010). Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047. *J Bacteriol* , 192:2463–2464.
 30. Rowe-Magnus DA, M. D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* , 292:115–25.

31. Sanders WE, S. C. (1997). Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* , 10:220–241.
32. Segal-Engelchin, D. &. (2008). Israeli students' patterns of career interests in an anti-social era. *Journal of Social Work Education*, 33(3), 139-157.
33. SFM., C. (2010). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
34. Soto S, G.-H. M. (2003). Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *JAntimicrob Chemother*, 51: 1287–91.
35. Soussy. (2007). Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Monographies en urologie*, 21-46.
36. Stock I, G. T. (2001). Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. *Int J Antimicrob Agents*, 18:537—45.
37. Thabaut. (2000). Antibiotic susceptibility and mechanisms of -lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study . *J. Antimicrob. Chemother*, 46:133–136.
38. Wang, W. Z. (2018). Preparation and Characterization of Self - assembly Hydrogels with Exfoliated Montmorillonite Nanosheets and Chitosan. *Nanotechnology*, 29, 025605.
39. Yong D., T. M. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla (NDM- 1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 5046-54.