

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité **Epidémiologie**

« ECOLE DOCTORALE PIERRE LOUIS DE SANTE PUBLIQUE : EPIDEMIOLOGIE ET
SCIENCES DE L'INFORMATION BIOMEDICALE »

Présentée par

Awa NDIR

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Epidémiologie et impact médico-économique
des infections hospitalières causées par les Entérobactéries
productrices de β -lactamases à spectre étendu
au Sénégal**

Thèse soutenue à Paris, le 16 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Véronique MERLE, PUPH (Rouen)

Rapporteur

Emmanuel RUSCH, PUPH (Tours)

Rapporteur

Eric CAUMES, PUPH (UPMC)

Examineur

Antoine ANDREMONT, PUPH (Paris VII)

Examineur

Didier GUILLEMOT, PUPH (UVSQ)

Examineur

Babacar NDOYE (Dakar)

Co-Encadrant de thèse

Pascal ASTAGNEAU, PUPH (UPMC)

Directeur de thèse

Au Professeur Pascal ASTAGNEAU, qui a dirigé cette thèse avec beaucoup de patience. Merci pour votre grande disponibilité et de m'avoir encouragé à donner le meilleur pour mener cette thèse.

Au Professeur Babacar NDOYE, qui a co-encadré cette thèse et m'a donné l'opportunité de mener ses travaux au Sénégal. Merci pour votre soutien et votre confiance.

Aux Professeurs Véronique MERLE, Emmanuel RUSCH, Eric CAUMES, Antoine ANDREMONT et Didier GUILLEMOT qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être membres de mon jury de thèse malgré leurs emplois du temps chargés.

Aux Docteurs Cheikh Tacko DIOP et Ousseynou BADIANE, qui ont toujours œuvré pour le bon déroulement de ces travaux et ma réussite professionnelle. Merci pour vos conseils avisés.

Aux Docteurs Amadou DIOP, Ndeye Mery BADIANE, Roughyatou KA, Papa Makhtar FAYE, Koumou ONANGA, Yaye Dior DIENG et à Thierno NDIAYE, Massamba SALL, Cheikh DJITE, Mamadou NDIAYE, Abdoulaye NDIAYE qui ont grandement contribué à la réalisation de ces travaux.

Aux Docteur Vincent RICHARD, Abdoulaye SECK, Cheikh LOUCOUBAR de l'Institut Pasteur de Dakar qui ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail. **A mes amis et collègues de l'Institut Pasteur de Dakar** qui m'ont beaucoup soutenu et rendent mes journées de travail agréables.

A Momar DIENG qui m'a permis de briser le fameux « plafond de verre ». Merci pour ton engagement et ta contribution inestimable dans cette thèse.

A mes parents, mon oncle Ismayla SY, mes tantes, toute ma famille et mes amis. Vous m'avez toujours soutenu et cru en moi, je vous dois tout, vous êtes ma force.

A Racky BARRO, qui a toujours eu les mots et gestes pour m'apaiser et me redonner confiance. Tu as éclairé ces 4 dernières années à Dakar et tu continues à être ma lumière malgré ton absence. Repose en paix Tanam.

AVANT-PROPOS

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications:

Titre de l'article 1: Infections caused by extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* : clinical and economic impact in patients hospitalized in two teaching hospitals in Dakar, Senegal.

Article soumis à la revue Antimicrobial Resistance and Infection Control (ARIC). En cours de révision (Annexe 2).

Titre de l'article 2 : Epidemiology and burden of bloodstream infections caused by extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in a pediatric hospital in Senegal.

Article soumis à la revue Plos One. Article accepté pour publication (Annexe 3).

Communications orales :

- **2011:** Infection and prevention control African (ICAN) - WINDHOEK: **Quality of data from first national prevalence surveys on nosocomial infections in African countries: the experience of Senegal**
- **2012:** Infection and prevention control African (ICAN) - CAPE TOWN: **Surveillance of multi-resistant bacteria in 2 hospitals in Dakar**
- **2012 :** Conférence des ministres de la santé de l'espace francophone (CIMSEF) - BENIN : **Place de la surveillance de la résistance bactérienne dans la lutte contre les Infections associées aux soins**
- **2013:** Infection Prevention Network (IPNET) -MOMBASA: **Infections caused by Extended spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae*: risk factors and clinical outcomes in a Senegalese hospital**

Posters :

- **2011:** International conference on prevention and infection control (ICPIC) - GENEVE:
Length of stay and mean cost of stay of healthcare-associated infections acquired in a national hospital in Senegal
- **2012:** Infection and prevention control African (ICAN) - CAPE TOWN: **Surveillance of bacteremia in a pediatric hospital**
- **2013:** International conference on prevention and infection control (ICPIC):
Evaluation of infectious risk management in a neonatal unit in Dakar

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
RESUME.....	10
ABSTRACT	11
CHAPITRE 1 : LES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE β-LACTAMASES A SPECTRE ETENDU	12
1 Les β -lactamines	13
2 Mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	14
3 Définition des BLSE	15
4 Historique des BLSE.....	15
5 Identification des souches productrices de BLSE.....	18
6 Transmission des souches productrices de BLSE	20
6.1 Principaux réservoirs des souches productrices de BLSE et modes de transmission en milieu communautaire	20
6.2 Transmission des souches productrices de BLSE en milieu hospitalier	21
6.3 Epidémiologie des souches productrices de BLSE dans le monde.....	22
6.3.1 Données globales.....	22
6.3.2 En Amérique Latine.....	23
6.3.3 En Chine.....	23
6.3.4 Aux Etats-Unis	23
6.3.5 En Europe	23
6.3.6 En France	24
7 Programme de maîtrise de la transmission des souches productrices de BLSE en France.....	26
7.1 Programme de lutte contre les BMR	26
7.2 Programme de lutte contre les EBLSE.....	29
7.3 Situation des EBLSE dans les pays en développement.....	29
7.3.1 Contexte des pays en développement.....	29
7.3.2 Spécificités en Afrique.....	30
7.3.3 Contexte Sénégalais.....	31
CHAPITRE 2 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE	33
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES	35
1 Contexte des études.....	36
2 Méthodologie des études	36
2.1 Populations d'études.....	36
2.2 Définitions.....	37
2.3 Sélection des cas et des témoins	38
2.4 Collecte des données	38
2.5 Définitions des indicateurs.....	38
2.6 Détection des souches productrices de BLSE.....	39
2.7 Analyses statistiques	39

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET PRESENTATION DES TRAVAUX	43
1 Epidémiologie et impact médico-économique des infections à EBLSE chez les patients hospitalisés (Etude 1).....	44
1.1 Description des souches d'entérobactéries isolées	44
1.2 Caractéristiques des patients inclus dans l'étude 1	45
1.3 Facteurs de risques d'acquisition d'une infection à EBLSE.....	46
1.4 Impact clinique de la production de BLSE sur la mortalité.....	48
1.5 Impact clinique de la production de BLSE sur la durée de séjour.....	50
1.6 Impact économique attribuable à la production de BLSE.....	51
2 Epidémiologie et impact clinique des bactériémies à EBLSE chez les enfants hospitalisés (Etude 2).....	52
2.1 Caractéristiques des patients inclus dans l'étude 2	53
2.2 Facteurs de risques d'acquisition d'une bactériémie à EBLSE.....	55
2.3 Impact clinique de la production de BLSE sur la mortalité.....	55
2.4 Impact clinique de la production de BLSE sur la durée de séjour.....	57
2.5 Impact clinique des prescriptions empiriques inappropriées.....	57
3 Synthèse des résultats des 2 études.....	58
CHAPITRE 5 : DISCUSSION	59
CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	68
REFERENCES.....	71
ANNEXE 1.....	80
ANNEXE 2.....	82
ANNEXE 3.....	106

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des tables

Table 1 :	Liste des β -lactamines
Table 2 :	Facteurs associés à la production de BLSE (modèle 1) et aux infections à EBLSE (modèle 2) : résultats des analyses univariées
Table 3 :	Facteurs de risque d'acquisition de la résistance BLSE (modèle 1) et d'une infection à EBLSE (modèle 2) : résultats des analyses multivariées
Table 4 :	Facteurs de risque de décès chez les patients hospitalisés: résultats des analyses uni et multivariées
Table 5 :	Allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE et hazard-ratio (HR) de sortie associé aux infections à EBLSE+ et EBLSE-
Table 6 :	Coûts moyens associés à la prise en charge d'une infection à EBLSE+ et d'une infection à EBLSE- et surcoût attribuable à la production de BLSE
Table 7 :	Facteurs associés à la production de BLSE et aux bactériémies à BLSE : résultats des analyses univariées
Table 8 :	Facteurs de risque d'acquisition de la résistance BLSE (modèle 1) et d'une bactériémie à EBLSE (modèle 2) : résultats des analyses multivariées Hospitalisés
Table 9 :	Facteurs de risque de décès chez les enfants hospitalisés : résultats des analyses uni et multivariées
Table 10 :	Allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE et hazard-ratio (HR) de sortie associé aux bactériémies à EBLSE+ et EBLSE-
Table 11:	Synthèse des résultats des 2 études

Liste des figures

- Figure 1 :** Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques
- Figure 2 :** Evolution de la découverte des antibiotiques et de l'émergence des résistances aux antibiotiques
- Figure 3 :** Evolution de la dissémination des souches BLSE de type CTX-M dans le monde entre 2001 et 2005
- Figure 4 :** Méthodes de détection phénotypique de la production de BLSE
- Figure 5 :** Représentation des principaux réservoirs de souches productrices de BLSE et des différents modes de transmission
- Figure 6 :** Situation épidémiologique des *E.coli* BLSE dans le monde en 2007
- Figure 7 :** Evolution du taux d'*E.coli* et de *K.pneumoniae* résistants aux C3G de 2003 à 2013 en Europe
- Figure 8 :** Incidence des infections à EBLSE par espèce en France de 2009 à 2013 (n=44 362)
- Figure 9 :** Baisse du taux de SARM de 1993 à 2007
- Figure 10 :** Evolution du taux d'incidence des SARM et des BLSE pour 1000 journées d'hospitalisation de 2002 à 2013
- Figure 11 :** Caractéristiques épidémiologiques comparées entre les SARM et les BLSE
- Figure 12 :** Populations des études
- Figure 13 :** Modèle multi-états utilisé pour estimer l'allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE
- Figure 14 :** Distribution des souches d'entérobactéries isolées et proportion de souches productrices de BLSE selon espèce (N=186)
- Figure 15 :** Types d'infections causées par les souches d'entérobactéries isolées des prélèvements à visée diagnostique (N=186)
- Figure 16 :** Flow chart de l'étude 2
- Figure 17 :** Distribution des souches d'entérobactéries et proportion de souches productrices de BLSE selon espèce (N=110)
- Figure 18 :** Souches bactériennes isolées des prélèvements à visée diagnostique - Etude pilote (N=276)

LISTE DES ABREVIATIONS

AC 2 BMR	Alliance Contre le développement des Bactéries Multi-Résistantes
BMR	Bactérie multirésistante
BLSE	β -lactamines à spectre étendu
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
C-CLIN	Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CDC	Center for Disease Control
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CTIN	Comité Technique national des Infections Nosocomiales
C3G	Céphalosporine de troisième génération
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E.cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
ERV	Entérocoque résistant à la vancomycine
HCSP	Haut Conseil de Santé Publique
ICAN	Infection control Africa Network
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
OMD	Objectif du Millénaire pour le Développement
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCIME	Prise en Charge Intégrée des Maladies de l'Enfant
PED	Pays En Développement
PRONALIN	PROgramme National de lutte contre les Infections nosocomiales
RAISIN	Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales
SARM	Staphylococcus Aureus Résistant à la Méthicilline
SHA	Solution hydro-alcoolique

RESUME

Contexte : Les infections causées par les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) constituent un problème de prise en charge majeur en milieu hospitalier dans le monde. Si la situation des EBLSE est de plus en plus décrite en Afrique, son ampleur reste peu documentée au Sénégal. L'objectif de cette thèse était de décrire l'épidémiologie des EBLSE et d'évaluer leur impact médico-économique en milieu hospitalier au Sénégal. **Méthodes :** Deux études épidémiologiques descriptives et analytiques de type cas-témoins (avec une variante cas vs cas) nichées dans la cohorte des patients hospitalisés ayant eu une EBLSE isolée des prélèvements diagnostiques ont été menées. L'une des études portait sur toutes les infections causées par une entérobactérie parmi les patients admis dans les 2 hôpitaux et l'autre portait plus spécifiquement sur les bactériémies parmi les enfants hospitalisés dans l'hôpital pédiatrique. Les cas étaient des patients avec une infection à EBLSE (EBLSE+) et des patients avec une infection à entérobactérie non BLSE (EBLSE-). Les témoins étaient des patients non infectés. Des analyses de régressions multivariées ont été réalisées pour identifier les facteurs de risque d'acquisition d'une infection à EBLSE et les facteurs de décès dans les 2 populations d'études. Par ailleurs, un modèle multi-états et une analyse économique de type « cost-of-illness » ont été menés pour estimer l'allongement de la durée de séjour attribuable aux EBLSE et le surcoût associé. **Résultats :** Le taux d'incidence des infections à EBLSE était de 3 cas/1 000 journées d'hospitalisation (JH) et de 1,5 cas/1000 JH pour les bactériémies en milieu pédiatrique. La présence de cathéters veineux centraux et urinaires ainsi que d'une ventilation mécanique étaient les facteurs de risque d'acquisition d'une infection à EBLSE. De plus, les nouveau-nés étaient identifiés comme un groupe de patients à risque. La production de BLSE était un facteur de risque de décès et était associée à une augmentation de la durée de séjour (+4jours) et du coût hospitalier (+100€). **Conclusion :** Les infections à EBLSE sont fréquentes en milieu hospitalier et ont un impact médico-économique considérable. La maîtrise de la dissémination des EBLSE, à travers la promotion des précautions standard d'hygiène et la bonne gestion des excréta est cruciale surtout en pédiatrie. Nos résultats suggèrent aussi de promouvoir le bon usage des antibiotiques, indispensable pour préserver l'efficacité des antibiotiques, en particuliers des carbapénèmes, dans les infections hospitalières.

Mots - clés : Afrique, EBLSE, mortalité, modèle multi-états, durée de séjour, coût

ABSTRACT

Infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL-E) are of major concern in clinical practice worldwide because of limited therapeutic options effective to treat them. Studies from Africa showed that ESBL are frequent in the continent, however the impact of these multidrug resistant infections is yet to be adequately determined. The aim of this thesis was to describe the epidemiological situation of ESBL-E in Senegal and to assess their clinical and economic impact. **Methods** : Two retrospective studies were carried out in inpatients from whom an *Enterobacteriaceae* strain was isolated from diagnostic samples drawn during a 6-month period (Study 1) and from blood cultures drawn within a 2-year period among pediatric patients (Study 2). Case-case-control studies were carried out to identify risk factors to acquire an ESBL-E infection. Patients infected by an ESBL-producing *Enterobacteriaceae* were defined as cases 1, those infected by an *Enterobacteriaceae* non-producer of ESBL were cases 2 and patients not infected by any bacterial strain were controls. Multivariable analyses using a stepwise logistic regression were performed to identify risk factors to acquire an ESBL-E infection and risk factors for death. Retrospective cohort analyses were performed to assess the prolonged length of stay attributable to ESBL production using a multistate model. Besides, a cost-of-illness analysis was performed to estimate the additional cost attributable to the prolonged length of stay. **Results** : Incidence rate of ESBL-infections was 3/1,000 patient-days (PD) and 1.5 cases/1,000 PD for bloodstream infections in children. Risk factors to acquire an ESBL infection were the presence of urinary catheter, central venous catheter and mechanical ventilation. Newborns were also identified as a patient- at risk to acquire an ESBL-E infection. ESBL production was identified as an independent risk factor for death. Besides, ESBL production was associated with an increased LOS (+4days) and cost (€100). **Conclusion** : Our findings show an important clinical and economic impact of ESBL infections in Senegal. Control of ESBL-E spread is an emergency especially in pediatric populations and can be achieved by the promotion of hand hygiene and proper management of excreta. Results also emphasize the need to revise current antibiotic prescriptions guidelines and to implement an antibiotic stewardship program to preserve the effectiveness of our last-resort antibiotic drugs.

Key-words : Africa, ESBL-E, mortality, multistate model, length of stay, cost

CHAPITRE 1 : LES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES

DE β -LACTAMASES A SPECTRE ETENDU

1 Les β -lactamines

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus couramment utilisés dans le monde pour traiter les infections bactériennes à cause de leur large spectre d'activité et leur faible toxicité. Ces antibiotiques sont actifs sur des bactéries en phase de croissance et agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane) par inactivation des principales enzymes impliquées dans cette construction : les PLP, protéines liant les pénicillines.

Table 1 : Liste des β -lactamines

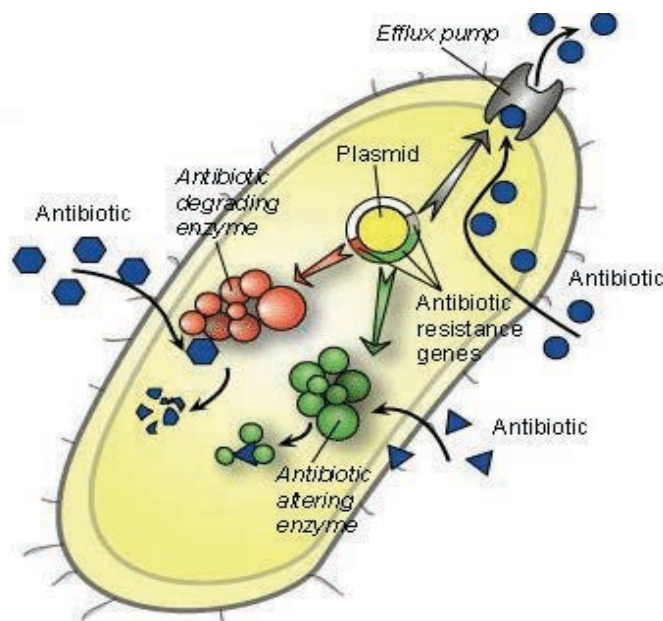
Famille d'antibiotique	Dénomination commune internationale	Nom commercial
Pénicillines		
	Peni G	<i>Oracilline®</i>
	Peni A	<i>Clamoxyl®</i>
	Péni M	<i>Flucloxacillin®</i>
Carboxy pénicillines	Ticarcilline	<i>Ticarpen®</i>
Uréido pénicillines	Pipéracilline	<i>Pipéracilline®</i>
Céphalosporines		
	C1G	<i>Kéflin®</i>
		<i>Kefzol®</i>
	C2G	<i>Méfoxin®</i>
		<i>Zinnat®</i>
	C3G	<i>Oroken®</i>
		<i>Rocéphine®</i>
Monobactames	Aztréonam	<i>Azactam®</i>
Carbapénèmes	Imipénème	<i>Tiénam®</i>
	Ertapénème	<i>Invanz®</i>

2 Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Les bactéries ont la capacité de développer des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Figure 1):

- par diminution de la perméabilité de leur paroi ou par hyperproduction de pompes d'efflux empêchant ainsi l'antibiotique d'atteindre sa cible
- par diminution de l'affinité pour les PLP empêchant l'antibiotique de se fixer à sa cible
- par production d'enzymes capables d'hydrolyser l'antibiotique.

Figure 1 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques



Source : Molton S et al. « The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria : a perspective from Asia ». Clin Infect Dis. 2013 [1]

Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines est la production d'enzymes appelées β -lactamases capables de les hydrolyser. Cette résistance peut être naturelle ou acquise. En effet, certaines bactéries possèdent un patrimoine génétique qui les rend naturellement résistantes à des antibiotiques (exemple : les *Klebsiella spp* aux aminopénicillines). Chez d'autres bactéries la résistance est dite acquise car résulte d'une modification génétique affectant le chromosome de la bactérie ou d'une acquisition de matériel génétique (un plasmide ou transposon) porteur d'un ou de plusieurs gènes de résistance provenant d'une autre bactérie (Figure 1).

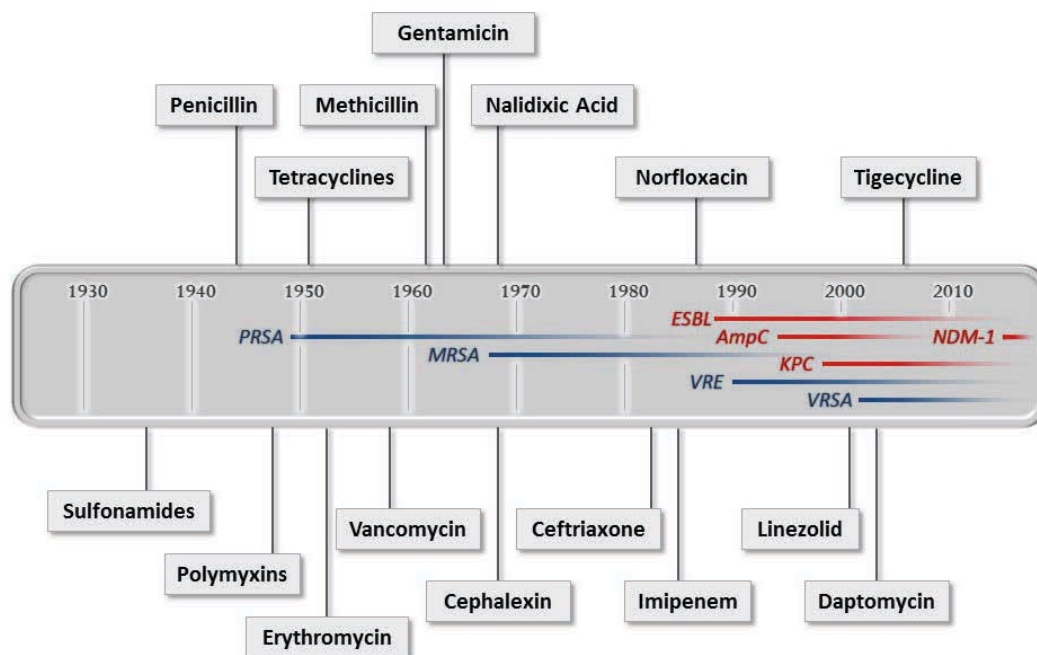
3 Définition des BLSE

Les BLSE sont des β -lactamases de classe A d'après la classification d'Ambler basée sur leur structure moléculaire [2]. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines (1^{ère}, 2^{ième}, 3^{ième} et 4^{ième} génération) et les monobactames [3,4]. Les BLSE confèrent donc une résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines (céfoxitine et céfotétan) et des carbapénèmes (imipénème, ertapénème, etc.). Cependant, elles peuvent être inhibées *in vitro* par l'acide clavulanique, le tazobactam ou le sulbactam [5,6]. Plusieurs variantes de BLSE existent, les plus fréquentes étant le type TEM (isolé à partir d'une souche d'*E.coli* chez un patient nommé Temoneira), SHV (pour Sulfhydryl variable) et CTX-M (pour cefotaxime- Munich). Les souches productrices de BLSE sont souvent multirésistantes à d'autres familles d'antibiotiques [6-8]. En effet, les gènes codant les BLSE sont souvent portés par des plasmides pouvant également porter des gènes de résistance codant pour d'autres familles d'antibiotiques telles que les aminosides ou les fluoroquinolones [9].

4 Historique des BLSE

Le premier mécanisme de résistance aux β -lactamines était la production de pénicillinases à spectre étroit après la commercialisation de la pénicilline au début des années 40 (Figure 2). Devant l'émergence de ces enzymes, des céphalosporines à spectre élargi de troisième génération (C3G) ont été développées dans les années 70-80. Cependant, leur utilisation hospitalière intensive a favorisé l'apparition précoce (1983) de nouvelles enzymes capables de les hydrolyser [10]. Ces enzymes, du fait de l'élargissement de leur activité, sont appelées β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Figure 2). La première BLSE décrite en 1983 en Allemagne était isolée en milieu hospitalier [9-11]. Ces BLSE principalement produites par les *Klebsiella spp* et les *Enterobacter spp* étaient associées à de nombreuses épidémies hospitalières notamment en réanimation [12]. Les BLSE les plus fréquentes étaient de type TEM ou SHV. En 1989, un nouveau type de BLSE capable d'hydrolyser le céfotaxime a été isolé chez un enfant de 4 mois à Munich d'où sa désignation CTX-M (CTX pour céfotaxime et M pour Munich).

Figure 2 : Evolution de la découverte des antibiotiques et de l'émergence des résistances aux antibiotiques

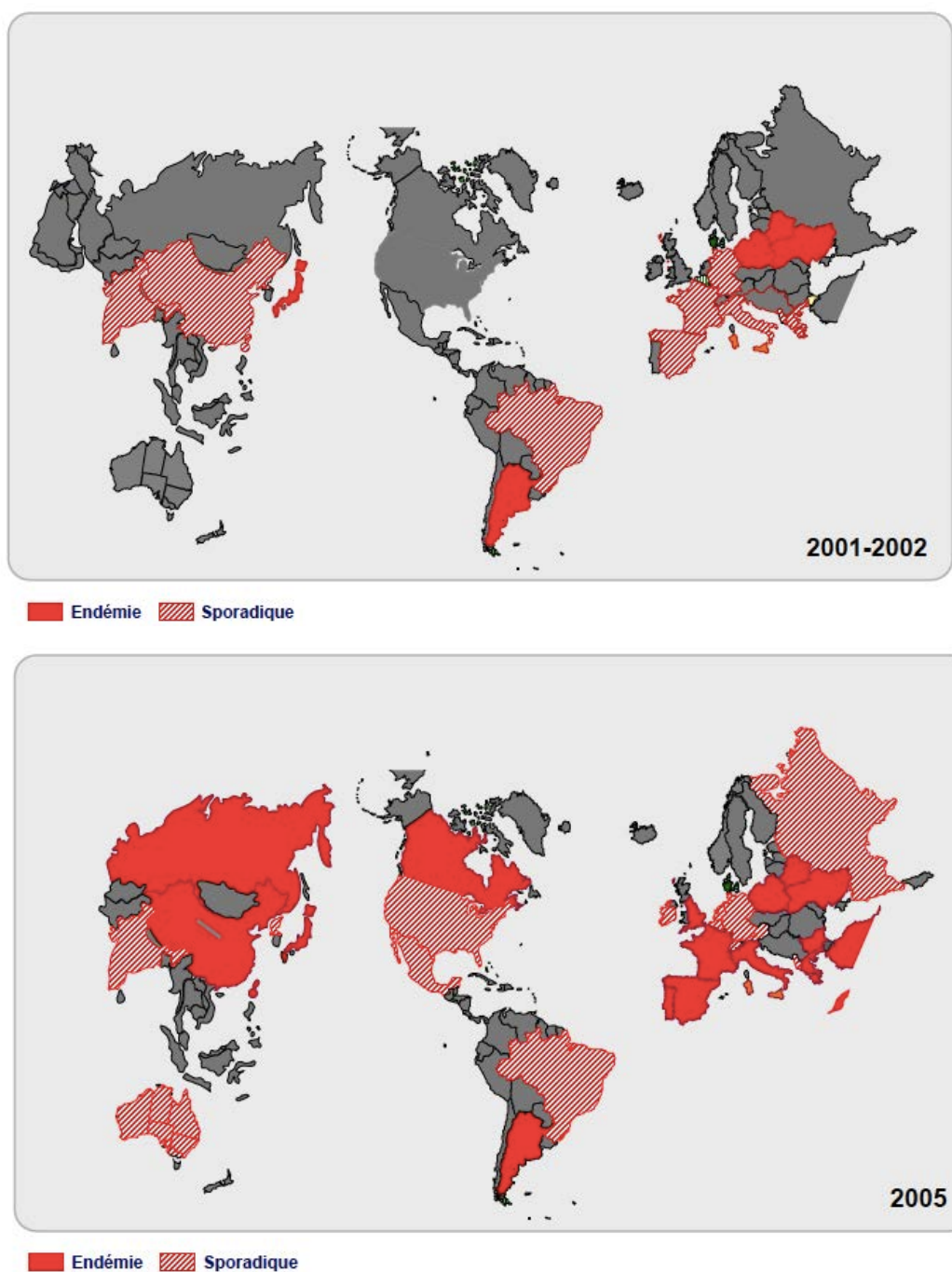


Légende : **PRSA** : Staphylocoque aureus résistant à la pénicilline, **MRSA** : Staphylocoque aureus résistant à la méthicilline, **ESBL** : Entérobactérie productrice de BLSE, **VRE** : Entérocoque résistant à la vancomycine, **VRSA** : Staphylocoque aureus résistant à la vancomycine, **KPC** : *Klebsiella pneumoniae* producteur de carbapénémase, **NDM-1** : New-Delhi metallo-beta-lactamase

Source : Molton S, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. « The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria : a perspective from Asia. Clin Infect Dis. 2013 [1]

L'émergence des CTX-M a apporté des changements majeurs dans l'épidémiologie des BLSE. En effet, à l'inverse des BLSE classiques de type TEM ou SHV issues de mutations génétiques des pénicillinases, les BLSE de type CTX-M dérivent des gènes chromosomiques naturellement présents chez les bactéries du genre *Kluyvera* provenant de l'environnement et ont été transférés par l'intermédiaire d'un plasmide à une souche adaptée à l'Homme, l'*E.coli* [9,13]. Les BLSE initialement produites par des espèces responsables d'épidémies hospitalières, sont aujourd'hui majoritairement produites par les *E.coli*, principale espèce d'entérobactérie présente dans le microbiote intestinale de l'Homme [14]. Dès les années 2000, le CTX-M est devenu le type dominant chez les entérobactéries BLSE et est en pleine expansion dans plusieurs pays dans le monde (Figure 3) [9, 12,15].

Figure 3 : Evolution de la dissémination des souches productrices de BLSE de type CTX-M dans le monde entre 2001 et 2005.



Source : Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination ; Rapport du HCSP. Février 2010 [16]

Les plasmides, éléments génétiques mobiles, ont joué un rôle central dans la dissémination des souches productrices de BLSE qui sont désormais aussi bien retrouvées en milieu

hospitalier qu'en milieu communautaire. Les BLSE restent principalement produites par les entérobactéries mais peuvent également être produites par des bactéries non fermentaires telles que les *Pseudomonas spp.* et *Acinetobacter spp.* [3]. En effet, les plasmides permettent le transfert du gène de résistance BLSE entre les espèces d'entérobactéries et à d'autres familles de bactéries [17,18].

5 Identification des souches productrices de BLSE

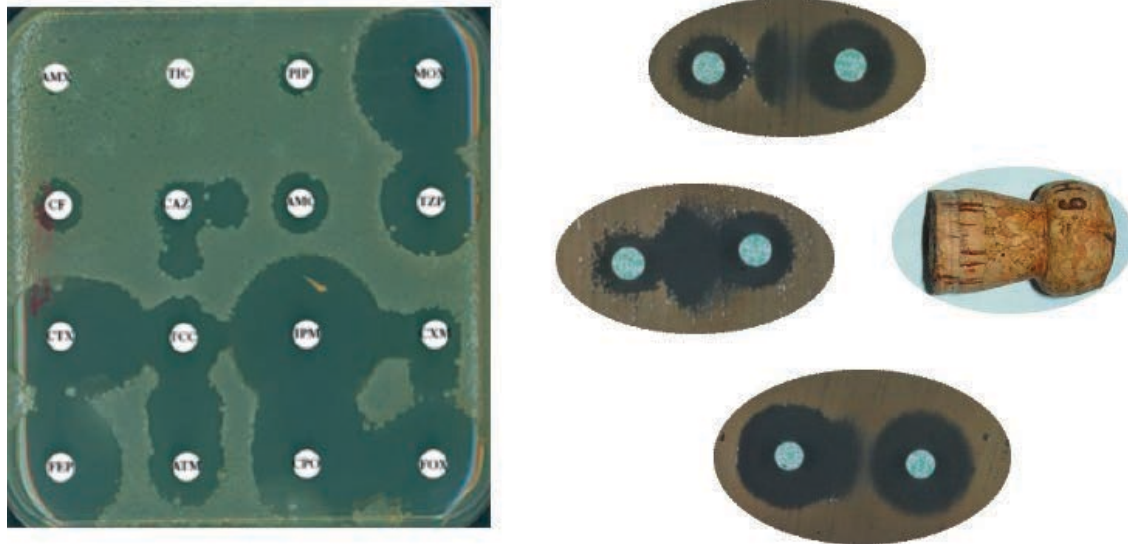
La production de BLSE par une souche bactérienne peut être confirmée par la recherche de résistance aux β -lactamines par des méthodes qualitative ou quantitative. La méthode qualitative, utilisée en routine dans les laboratoires, consiste à évaluer la synergie entre deux disques d'antibiotiques sur un antibiogramme standard c'est à dire un disque de céfotaxime, ceftazidime ou céfépime distants de 30 mm d'un disque contenant de l'acide clavulanique (amoxicilline + acide clavulanique). La présence de BLSE s'exprime par l'apparition d'une synergie en « bouchon en champagne » (Figure 4). Chez les souches également hyperproductrices de céphalosporinases la détection de l'image de synergie peut être facilitée par le rapprochement des disques de céphalosporine de celui du disque contenant l'acide clavulanique ou en pratiquant un antibiogramme standard sur gélose de Mueller-Hinton additionnée de 250 mg de cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase). Chez certaines espèces très sensibles aux β -lactamines (*P.mirabilis*, *P.vulgaris*, *P.penneri*, *P.stuartii* et *P.rettgeri*) les BLSE s'expriment à bas niveau. Leur détection est donc facilitée en plaçant les disques à une distance de 40-45 mm au lieu de 30 mm selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [19] (Figure 4). Des méthodes quantitatives telles que la méthode des disques combinés ou le E-test peuvent également être utilisées. La méthode des disques combinés repose sur la mesure d'une augmentation de 5 mm du diamètre de la zone d'inhibition d'un disque de céfotaxime, ceftazidime et céfépime combiné(s) à l'acide clavulanique comparativement à la zone d'inhibition autour ce(s) même(s) disque(s) sans acide clavulanique [19]. Le E-Test quant à lui se présente sous la forme de bandelettes imprégnées d'un côté par un gradient de céfotaxime, de céfépime ou de ceftazidime et de l'autre côté par un gradient de la même céphalosporine + acide clavulanique à concentration constante (4mg/l). Cependant ce test coûte cher et n'est pas à la portée des laboratoires des pays en développement.

A coté de ces méthodes phénotypiques, des méthodes génotypiques peuvent être utilisées et sont basées sur les techniques d'amplification par PCR permettant de détecter les gènes codants les BLSE. Elles permettent aussi de détecter simultanément au sein d'une même souche la présence de gène codant pour divers β -lactamases.

Par ailleurs, des systèmes automatisés (exemple Vitek Biomérieux) permettent à partir du prélèvement d'identifier à la fois la souche bactérienne et de détecter la présence de BLSE.

Figure 4: Méthodes de détection phénotypique de la production de BLSE

Méthode de diffusion des disques en milieu gélosé

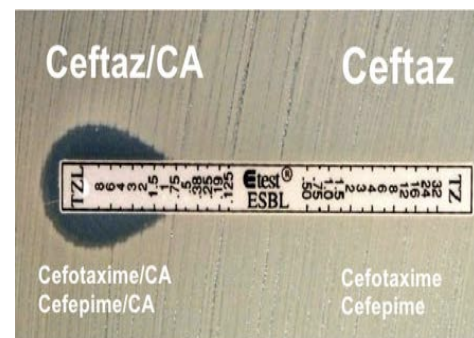


E.coli producteur de BLSE. Image caractéristique dite en « bouchon de champagne » permettant de détecter la production d'une BLSE.

Méthode des disques combinés



Méthode E-Test



6 Transmission des souches productrices de BLSE

Les BLSE sont principalement produites par les souches d'*E.coli*, de *Klebsiella spp* et d'*Enterobacter spp* bactéries commensales du tube digestif de l'homme. Les selles représentent donc un important réservoir potentiel de souches productrices de BLSE. En effet, un porteur d'*E.coli* BLSE peut éliminer chaque jour plus de 10^8 de ces souches résistantes par gramme de selles. Les urines normalement stériles peuvent également contenir des souches productrices de BLSE en cas d'infection urinaire causée par des souches productrices de BLSE.

6.1 Principaux réservoirs des souches productrices de BLSE et modes de transmission en milieu communautaire

Les souches productrices de BLSE sont présentes dans l'environnement et particulièrement dans les effluents qui ont un rôle important dans leur dissémination (Figure 5). Une étude menée à Besançon a montré parmi les souches *E.coli* retrouvées dans l'environnement, un taux de BLSE de 7,6% dans les effluents hospitaliers et de 0,10% dans les effluents communautaires [20]. L'eau contaminée souvent utilisée pour arroser les plantes peut expliquer la présence de souches BLSE dans les fruits et légumes rapportée par plusieurs auteurs [21-23]. L'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques chez les hommes l'est également chez les animaux où les antibiotiques sont utilisés comme facteur de croissance ou à titre préventif à l'ensemble de l'élevage. Ce mésusage des antibiotiques favorise l'émergence de souches résistantes. Les souches BLSE peuvent être présentes dans les excréments des animaux qui, utilisés comme engrais dans les cultures, peuvent contaminer la chaîne agro alimentaire. De plus, des auteurs ont montré que des souches d'*E.coli* BLSE isolées de viande de volaille étaient identiques d'un point de vue génétique aux souches retrouvées chez les consommateurs de cette viande [24,25]. Les aliments représentent donc une voie principale de transmission des souches productrices de BLSE de l'animal à l'Homme. Par ailleurs, des souches d'*E.coli* BLSE trouvées chez des éleveurs de porcs et de volailles suggèrent que l'exposition professionnelle par des contacts avec des animaux porteurs de souches productrices de BLSE est également une voie de transmission de ces souches de l'animal à l'Homme [26].

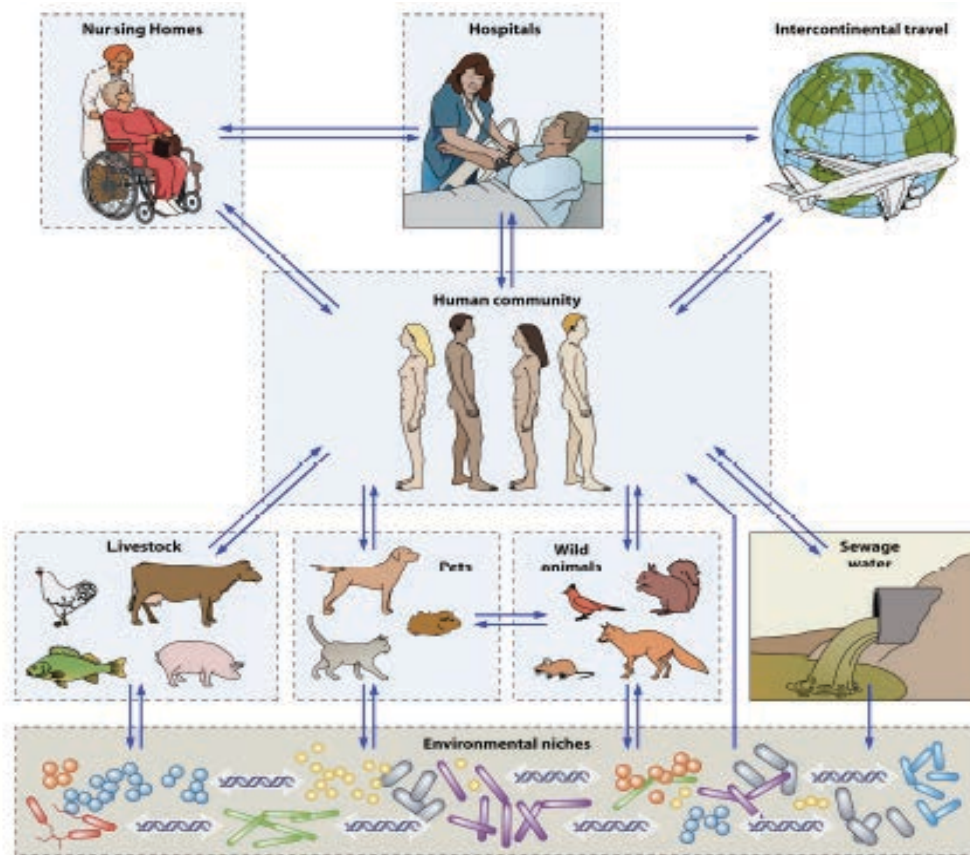
Les personnes porteuses de souches BLSE définies comme des cas index peuvent ensuite transmettre ces souches à leur entourage. Plusieurs auteurs ont montré un taux de portage fécal de souches BLSE chez les membres de la famille de cas index variant de 15,6% à 42% [27,28]. Peter et al. ont mis en évidence la transmission de souches d'*E.coli* BLSE entre un père admis pour une infection urinaire à *E.coli* BLSE et sa fille admise par la suite aux urgences pour choc septique causée par la même souche bactérienne. La fille aurait contracté la souche résistante lors de contact avec son père pendant le séjour hospitalier de ce dernier [29]. La transmission familiale de souches BLSE a également été traitée par Tandé et al. qui ont démontré un taux de portage de souches BLSE de 22% parmi les membres des familles d'adoption d'enfants originaires du Mali et porteurs de souches BLSE 9 mois après leur arrivée en France [30,31].

Les voyages dans certains pays où la situation des BLSE est endémique favorisent la dissémination rapide de ces souches dans le monde et particulièrement dans les pays, tels que ceux du nord de l'Europe, où le taux d'incidence des BLSE est faible. En effet, des études menées au Pays-Bas et en Scandinavie chez des voyageurs non porteurs de souches BLSE à leur départ ont montré un taux de portage de souches BLSE variant de 24% à 30% à leur retour dans le pays [32,33]. La durée du portage des BLSE pouvait atteindre 3 mois voir 3 ans augmentant ainsi le risque de transmission croisée.

6.2 Transmission des souches productrices de BLSE en milieu hospitalier

L'hôpital est un milieu propice à la transmission des BMR. En effet, l'utilisation d'antibiotiques chez le patient porteur de souches BLSE favorise la sélection des souches résistantes qui peuvent être à l'origine d'infections souvent graves. De plus, la multiplicité des actes réalisés chez le patient et le non respect des règles d'hygiène au cours des soins contribuent à la dissémination des germes résistants. Dans le cas particuliers des souches BLSE, l'absence d'une gestion rigoureuse des excréta expose le personnel de santé, le patient et son environnement à une éventuelle contamination.

Figure 5: Représentation des principaux réservoirs de souches productrices de BLSE et des différents modes de transmission.



Source : Woerther et al. Trends in human fecal carriage of extended spectrum bêta-lactamases in the community : toward the globalization of CTX-M [34]

6.3 Épidémiologie des souches productrices de BLSE dans le monde

6.3.1 Données globales

Les entérobactéries BLSE sont largement reportées dans le monde (Figure 6). Les réseaux de surveillance révèlent un taux d'incidence des entérobactéries BLSE variable selon le pays avec une dominance des *K.pneumoniae* BLSE en Amérique Latine (44,0%), dans les régions de l'Asie pacifique (22,4%), en Europe (13,3%) et en Amérique du nord (7,5%) [28,35].

Par ailleurs, des souches d' *E.coli* BLSE de type CTX-M sont largement disséminées dans le monde et sont retrouvées en situation endémique en Asie, en Amérique du sud et en Europe [36].

Figure 6: Situation épidémiologique des *E.coli* BLSE dans le monde en 2007



Source : Rapport du HCSP. Recommendations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination [16]

6.3.2 En Amérique Latine

Dans cette région, le taux d'incidence de souches productrices de BLSE est parmi les plus élevé au monde avec un taux variable de 45% à 51% pour *K.pneumoniae* BLSE et de 8.5% à 18% pour *E.coli* BLSE [37,38].

6.3.3 En Chine

Dans ce pays, le taux d'incidence de souches productrices de BLSE variait entre 13% et 15% chez *E.coli* et était supérieur à 20% pour *K.pneumoniae* BLSE [39].

6.3.4 Aux Etats-Unis

Le faible taux de prévalence des souches productrices de BLSE observé aux Etats-Unis a été confirmé par les données du réseau MYSTIC indiquant un taux inférieur à 1,5% pour *E.coli* BLSE et un taux variant de 2,4 à 4,4% pour *Klebsiella spp* BLSE entre 1999 à 2004 [40].

Par ailleurs, le CDC a révélé un taux de prévalence de souches productrices de BLSE inférieur à 1% en milieu hospitalier [41].

6.3.5 En Europe

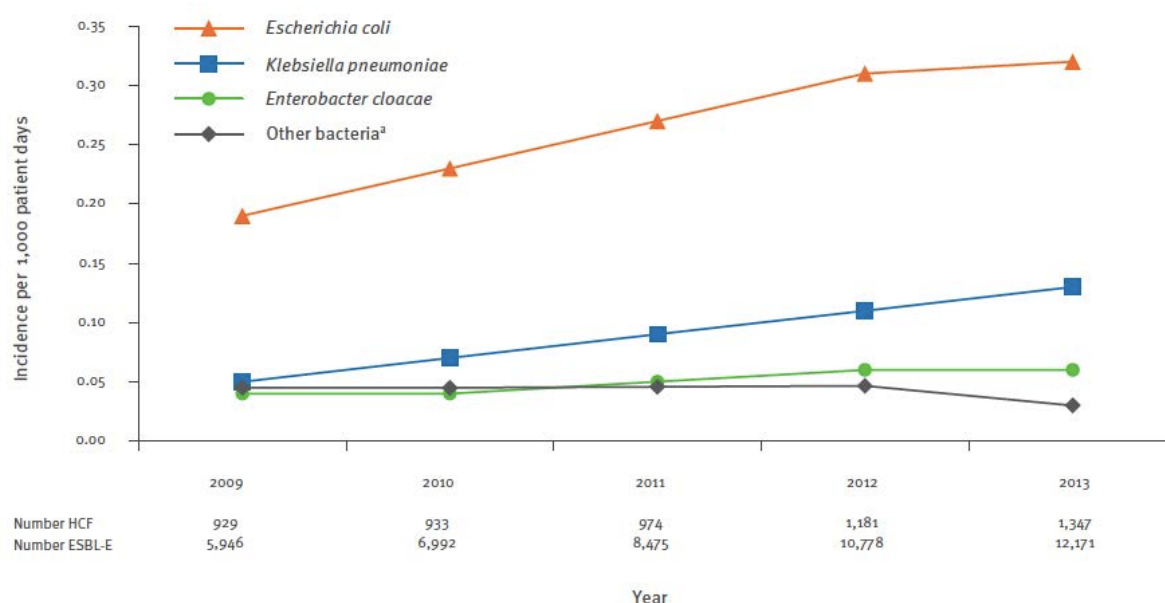
La prévalence des souches productrices de BLSE est plus élevée dans les pays du sud ou de l'est de l'Europe que dans les pays du nord. Le réseau de surveillance de la résistance

bactérienne en Europe (EARSS) a montré une croissante évolution de la proportion de *E.coli* et de *K.pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération depuis les années 2002 (Figure 7). En 2013, les données de surveillance ont révélé de fortes disparités entre les pays avec un taux de prévalence d'*E.coli* variant de 5% (Islande) à 38,9% (Chypre) et un taux de *K.pneumoniae* variant de 0% (Islande) à 70,1% (Grèce) [42].

6.3.6 En France

Les enquêtes de surveillance menées par le réseau BMR-RAISIN ont révélé une augmentation du taux d'incidence des souches BLSE de 0,35 à 0,60/1 000 journées d'hospitalisation entre 2009 et 2013 (Figure 8) [43,44]. En 2013, *E.coli* était la principale espèce productrice de BLSE (59%) suivi des *K.pneumoniae* (20%) [44].

Figure 8 : Incidence des infections à EBLSE par espèce en France de 2009 à 2013 (n=44 362)

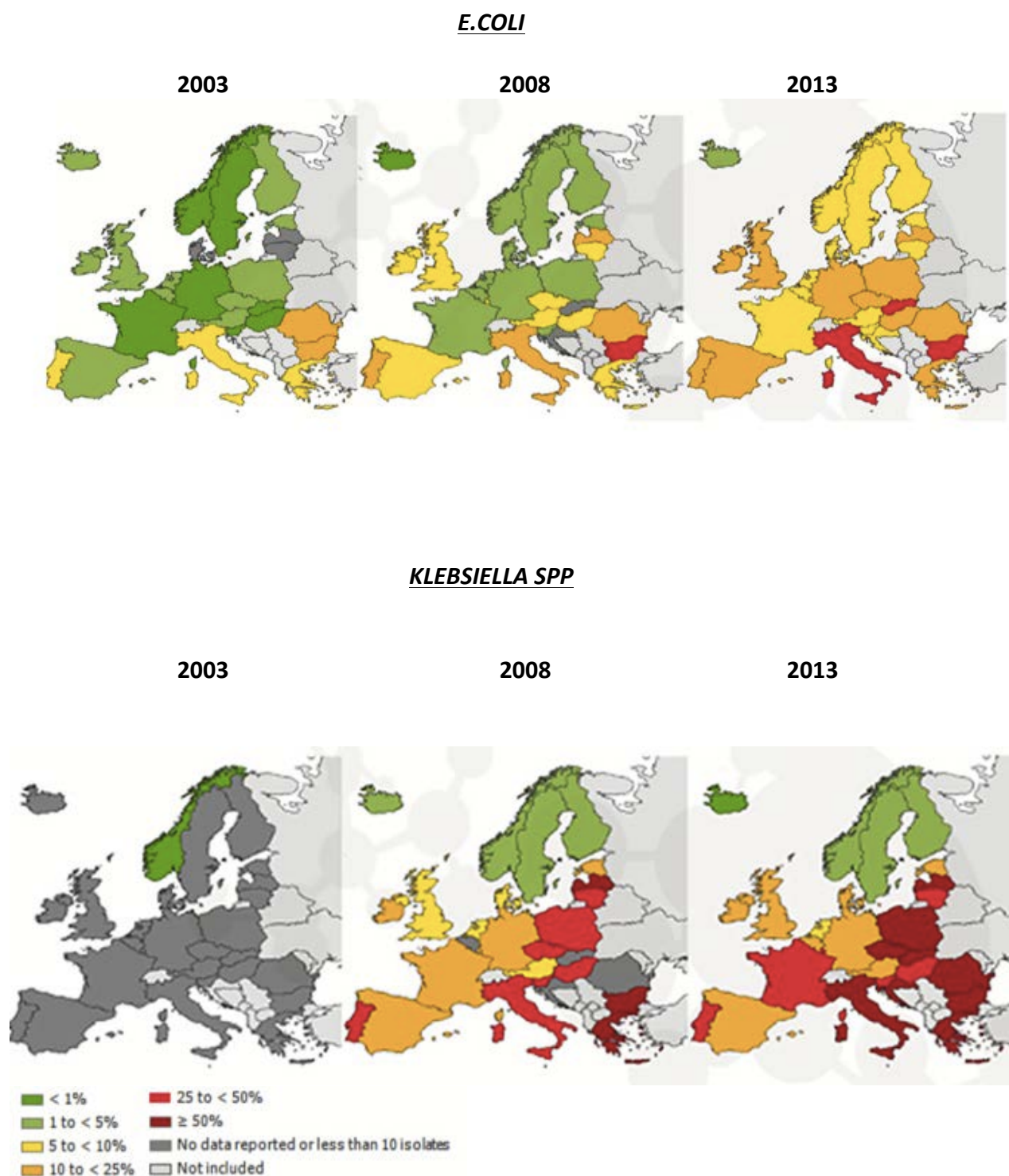


ESBLE: Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*; HCF: healthcare facilities.

^a *Citrobacter* spp, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Serratia* spp.

Source : Arnaud I et al. Ongoing increasing temporal and geographical trends of the incidence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* infections in France, 2009 to 2013. [44]

Figure 7 : Evolution du taux d'*E.coli* et de *K.pneumoniae* résistants aux C3G de 2003 à 2013 en Europe



Source : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [42]

7 Programme de maîtrise de la transmission des souches productrices de BLSE en France

7.1 Programme de lutte contre les BMR

La lutte contre la diffusion des BMR à l'hôpital est une des priorités de la politique nationale de prévention des infections nosocomiales et de la maîtrise de la résistance aux antibiotiques en France. Au niveau national cette lutte est coordonnée depuis 2001 par le réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (BMR-RAISIN). Ce réseau s'appuie sur les cinq centres interrégionaux de coordination de lutte contre les infections nosocomiales (C-CLIN). Au niveau des hôpitaux, la lutte contre la résistance bactérienne est organisée autour des comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) créés en 1992 et du Comité Technique national des Infections Nosocomiales (CTIN). Le rôle du CLIN consiste à organiser, planifier et animer la lutte contre les infections associées aux soins dans les établissements. Il définit la politique que les hygiénistes, l'équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière et l'ensemble des personnels médicaux, paramédicaux et techniques des services mettront en application [45].

Des programmes de lutte contre les BMR basés sur la prévention de la transmission croisée ont été progressivement mis en place dans de nombreux hôpitaux, d'abord en 1993 à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, puis dans le reste de l'interrégion Paris-Nord puis enfin au niveau national. Ces programmes reposaient sur les mesures suivantes :

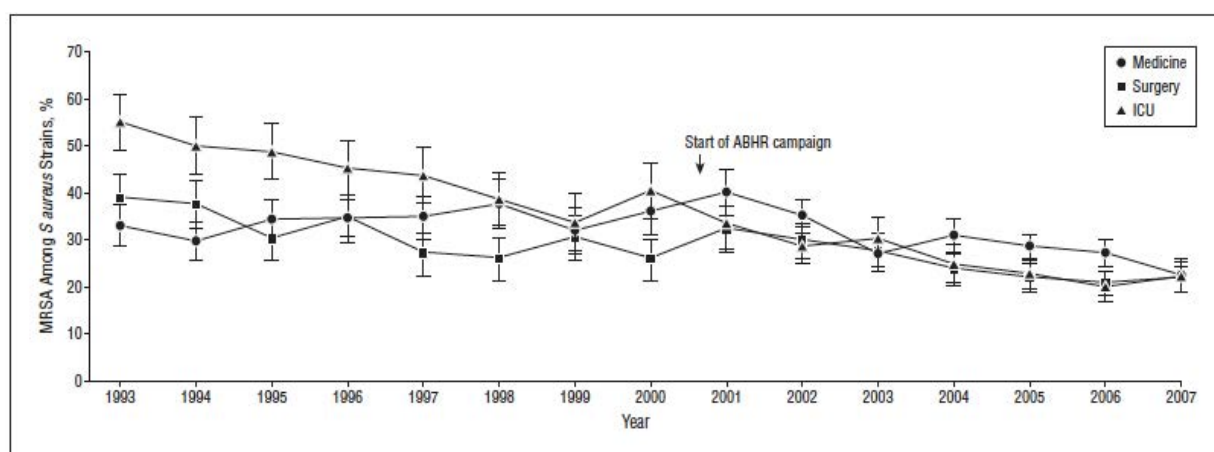
- l'identification des patients porteurs de BMR et leur isolement
- la notification rapide de l'isolement d'un germe résistant et son signalement sur le dossier du patient pour le repérer facilement lors de transfert ou d'une nouvelle hospitalisation
- la prévention de la transmission croisée en établissant des barrières de précautions pour les patients infectés ou colonisés par l'hygiène des mains (lavage des mains ou désinfection par friction hydro-alcoolique), le port des gants ou blouses au cours des soins, l'isolement en chambre individuelle,
- le dépistage des porteurs et la décolonisation.

En parallèle, depuis 2001 trois plans nationaux d'alerte sur les antibiotiques ont été élaborés pour préserver l'efficacité des antibiotiques. Des campagnes d'information sur les

antibiotiques ont été lancées avec des messages forts pour promouvoir le bon usage des antibiotiques dont le plus célèbre est « les antibiotiques, c'est pas automatique ».

Ces différentes mesures ont permis de réduire le taux d'incidence des SARM de 35% de 1993 à 2007 [46,47]. La campagne de la promotion de l'hygiène des mains avec l'introduction des solutions hydro-alcooliques en 2000 semble avoir eu un impact positif sur cette réduction (Figure 9).

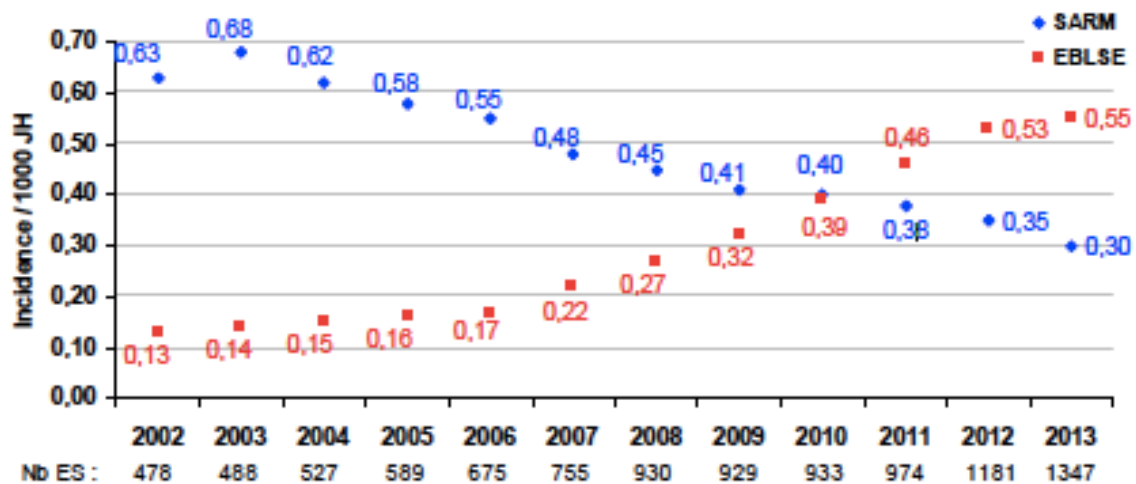
Figure 9: Baisse du taux d'incidence des SARM de 1993 à 2007



Source : Jarlier et al. Curbing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program [47]

La croissante évolution du taux d'incidence des EBLSE [46] suggère que ces mesures efficaces sur les SARM ne l'étaient pas pour maîtriser la diffusion des EBLSE (Figure 10). En effet, l'émergence de BLSE de type CTX-M majoritairement produites par *E.coli* a contribué à la dissémination des BLSE hors de l'hôpital, en milieu communautaire où les mesures d'hygiène hospitalière ne sont pas transposables [14].

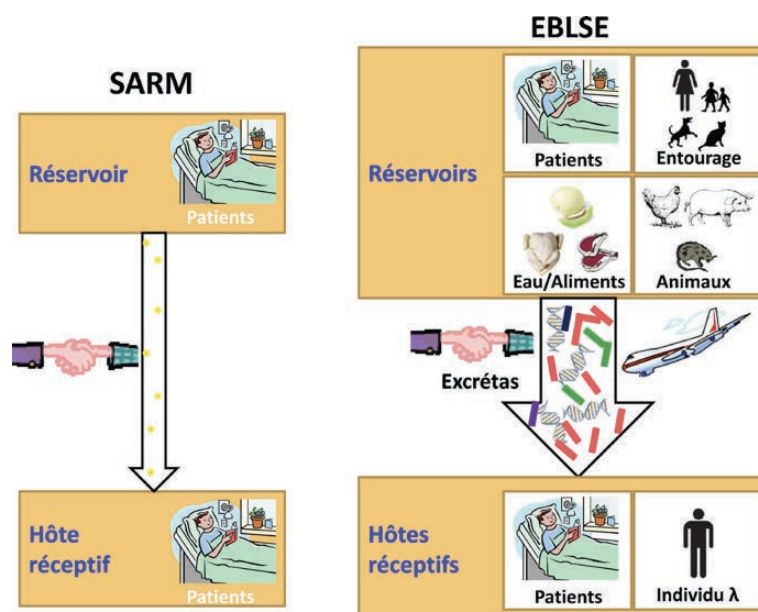
Figure 10 : Evolution du taux d'incidence des SARM et des EBLSE pour 1 000 journées d'hospitalisation de 2002 à 2013



Source : Rapport BMR RAISIN 2013 [43]

Comparé aux SARM, la difficulté de maîtriser la diffusion des EBLSE repose sur la taille du réservoir inaccessible à une décolonisation, la difficulté de dépister tous les patients porteurs et le rôle central des excréta et des voyages dans des zones endémiques dans la dissémination des souches BLSE (Figure 11).

Figure 11 : Caractéristiques épidémiologiques comparées entre les SARM et les EBLSE



Source : Lucet JC , Birgand G. Les bacilles à Gram négatif multirésistants : où va t-on ? [48]

7.2 Programme de lutte contre les EBLSE

Le HCSP a établi en 2010 des recommandations concernant les mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination [16].

Ces mesures reposaient sur :

- la sensibilisation du personnel de santé sur la diffusion épidémique des *E.coli* BLSE
- la surveillance épidémiologique des entérobactéries BLSE au niveau national et le suivi du taux de résistance au sein de l'espèce *E.coli*
- l'application des mesures d'hygiène notamment les précautions complémentaires « contact » à tous les patients infectés ou colonisés
- la promotion de l'hygiène des mains et de la gestion des excréta
- la recherche d'une colonisation digestive à entérobactérie BLSE chez les sujets contacts d'un cas (porteur ou infecté par une EBLSE)
- le développement de la recherche en menant des études complémentaires pour améliorer les connaissances sur les facteurs de risque de colonisation des *E.coli* BLSE, les aspects vétérinaires et environnementaux et sur le rôle des effluents dans la diffusion des souches productrices de BLSE

7.3 Situation des EBLSE dans les pays en développement

7.3.1 Contexte des pays en développement

La situation des EBLSE semble être plus alarmante dans les pays en développement (PED) que dans le reste du monde. Woerther et al. ont estimé que 1,1 milliard de personnes étaient porteurs de EBLSE en Asie du Sud-est et 110 millions en Afrique contre 48 millions aux Etats-Unis et 35 millions en Europe [34]. Les auteurs ont suggéré que le manque d'accès à l'eau potable, la pauvreté et la forte densité de population caractéristiques des PED pourraient fortement contribuer à la dissémination des souches BLSE et expliquer le nombre important de porteurs de souches BLSE dans ces pays. Des auteurs ont confirmé l'hypothèse selon laquelle une forte densité de population favorisait la diffusion de souches productrices de BLSE en démontrant un index de colonisation inversement proportionnel au nombre de m² par personne [49]. Par ailleurs, l'UNICEF a révélé qu'en 2011, 57% de la population des PED utilisaient des installations d'assainissement améliorées alors que 18% continuaient à

déféquer en plein air (particulièrement en Inde) favorisant ainsi le risque de transmission de souches BLSE dans ces pays [50]. De plus, plusieurs auteurs ont montré que les voyages dans les PED favorisaient la diffusion des souches BLSE dans le monde. Laupland et al. ont montré que les voyages dans des pays tels que l'Inde (OR=145,6), le Moyen-Orient (OR=18,1) ou l'Afrique (OR=7,7) étaient un facteur de risque important de présenter une infection urinaire causée par une souche d'*E.coli* BLSE [51]. Tangdén et al. ont également montré, parmi des patients Suédois non porteurs de souches BLSE à leur départ en voyage, un taux de portage plus élevé chez les patients ayant voyagé en Inde que ceux ayant voyagé dans d'autres pays ($p<0,001$) [52]. En France, une étude portant sur des voyageurs non porteurs de BLSE à leur départ de France a montré un taux de portage de souches BLSE de 72,4% chez ceux ayant voyagé en Asie et de 47,7% chez ceux ayant voyagé en Afrique [53].

7.3.2 Spécificités en Afrique

En Afrique, l'épidémiologie des souches productrices de BLSE est encore peu connue comparée au reste du monde. Cependant, les études publiées suggèrent une situation endémique avec des taux de prévalence différents selon les pays [54,55]. Tansarli *et al.* ont montré que la proportion de souches BLSE était inférieure à 15% dans 16 études sur les 26 analysées et ont conclu que la proportion de souches BLSE en Afrique n'était pas élevée. Cependant ces résultats ne permettent pas d'estimer l'étendue de la situation sur le continent Africain vu que la plupart des études étaient conduites dans les pays de l'Afrique du nord et du sud (Figure 6). D'autres auteurs ont révélé des taux de prévalence de souches BLSE isolées en milieu hospitalier variant de 38,3% au Rwanda [56] à 68.8% au Cameroun [57].

Plusieurs études ont montré un portage de souches BLSE fréquent en milieu communautaire [57-60]. Cependant les hôpitaux des pays d'Afrique semblent être des endroits propices à la recrudescence des souches BLSE. Une étude menée à Madagascar a révélé une augmentation significative du taux de portage de souches BLSE à la sortie de l'hôpital (21,2% à l'admission versus à 57,1% à la sortie) [61]. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette augmentation: les prescriptions massives d'antibiotiques avant l'admission hospitalière, la non application des précautions standard lors des soins, le manque de chambres individuelles pour isoler le patient en cas de colonisation ou d'infection par une souche

résistante, le manque de WC individuel pour chaque patient et l'implication de la famille du patient dans la gestion des excréta les exposant ainsi à un risque de contamination et de dissémination des souches BLSE.

7.3.3 Contexte Sénégalais

Contexte du pays

Le Sénégal est un pays à ressources limitées où le revenu moyen par habitant est 87€. Les dépenses de santé représentent 4,2% du PIB et 10,4% du budget de fonctionnement de l'Etat [62]. Les dépenses privées de santé représentent 58,2% des dépenses totales de santé et sont constituées à 95,3% par les paiements directs des usagers (soit 55% de la dépense totale en santé). La population sénégalaise est jeune et constituée de 42% de personnes âgées de moins de 15 ans [63]. Le taux de mortalité chez les enfants âgés de moins de 5 ans est de 47 pour 1000 et le taux de mortalité maternelle de 392 par 100 000 naissances vivantes [64].

Pour permettre l'accessibilité des soins, le gouvernement a opté pour une décentralisation des structures de santé. Le système de santé se présente alors sous la forme d'une pyramide à 3 niveaux : celui du niveau opérationnel avec les districts sanitaires (1 277 postes de santé, 60 centres de santé), les régions médicales (11) et le niveau national (20 hôpitaux). Le pays compte 1 médecin pour 12 373 habitants (norme OMS : 1 pour 11 000 habitants), 1 infirmier pour 4 320 habitants (norme OMS : 1/ 3000) et 1 sage-femme pour 2 426 femmes en âge de reproduction (norme OMS : 1/300) [65].

Le programme de lutte contre les BMR

Le ministère de la santé du Sénégal a créé en 2004 un programme national de lutte contre les infections nosocomiales (PRONALIN) dans le cadre de sa politique de santé donnant une large part à l'hygiène et à la prévention. L'objectif général de ce programme est de réduire l'incidence des infections associées aux soins par une amélioration de l'hygiène et de la qualité de la prise en charge des patients dans les structures sanitaires. Un des objectifs spécifiques est de réduire le taux d'incidence des infections causées par les bactéries multirésistantes en milieu hospitalier. Le PRONALIN a donc mis en place dans chaque hôpital un CLIN et une commission spéciale sur les thèmes prioritaires qui sont l'hygiène des mains,

l'antibiorésistance, la gestion des déchets biomédicaux et la stérilisation. Accordant une place importante à la formation des personnels soignants, le programme a organisé des sessions de formation des personnels de santé des différentes structures de santé du pays.

En 2012, le PRONALIN a évalué les pratiques et les stratégies mises en place pour promouvoir l'hygiène des mains dans les hôpitaux au niveau national. Cette enquête évaluait les 5 éléments de la stratégie multimodale de l'OMS pour l'hygiène qui étaient [66] :

- Le changement de système
- L'éducation et la formation
- Les évaluations et la restitution des résultats
- Les rappels sur le lieu de travail
- La culture institutionnelle de la sécurité

A l'issue de cette évaluation, chaque établissement était classé dans un des niveaux suivants :

- niveau inadéquat : la promotion et les pratiques d'hygiène des mains sont déficientes. Des améliorations substantielles sont nécessaires.
- niveau basique : des mesures sont en place mais ne satisfont pas aux normes.
- niveau intermédiaire : une stratégie promotionnelle appropriée est appliquée et les pratiques se sont améliorées. Le développement de plans à long terme reste déterminant pour la durabilité du programme et des améliorations.
- niveau avancé : la promotion et les pratiques d'hygiène des mains sont optimales, permettant à l'établissement de développer une culture de la sécurité

Les résultats de cette enquête ont montré un niveau d'hygiène basique dans 14 hôpitaux et un niveau inadéquat dans 6 hôpitaux. Des mesures correctrices ont donc été proposées aux hôpitaux afin d'élaborer un programme d'établissement pour améliorer leur niveau.

Par ailleurs, une autre enquête nationale menée en 2012 a révélé une mauvaise gestion des déchets biomédicaux souvent réalisée avec un matériel et un équipement inadaptés (39,3%), une décontamination effectuée sans le respect des procédures (51,9%) et une stérilisation avec un matériel inadapté (97,3%).

CHAPITRE 2 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Quelques études publiées en Afrique suggèrent que la diffusion des souches productrices de BLSE est un phénomène alarmant en pleine émergence dans les PED [54, 55, 67-69]. La multirésistance, en réduisant considérablement les options thérapeutiques, fait craindre un emballement du phénomène dans le contexte des pays ne disposant pas à priori des ressources nécessaires pour mettre en œuvre des programmes de lutte, comme font craindre les premiers cas de résistance aux carbapénèmes rapportés récemment dans certains pays d'Afrique [70-72]. Si les EBLSE ont été décrites dans quelques pays africains, peu d'informations sont disponibles sur l'ampleur de ce problème au Sénégal tant en termes de morbi-mortalité que d'impact socio-économique. Néanmoins, une première étude pilote réalisée dans deux hôpitaux à Dakar a montré une proportion importante de BLSE parmi les souches d'entérobactéries (59,2%) isolées des prélèvements à visée diagnostique (Annexe 1).

L'objectif général de ce travail de thèse était d'évaluer le fardeau clinique et économique des infections à entérobactéries productrices de BLSE en milieu hospitalier au Sénégal.

Les objectifs spécifiques étaient :

1. d'estimer l'incidence des infections à entérobactéries BLSE
2. de déterminer les groupes d'individus les plus à risque d'acquisition des infections à entérobactéries BLSE
3. d'évaluer l'impact de la production de BLSE sur la mortalité et la durée de séjour des patients
4. d'estimer le surcoût financier attribuable à la production de BLSE
5. d'évaluer plus particulièrement l'impact clinique de la production de BLSE dans les infections sévères (bactériémies) chez les jeunes enfants

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES

1 Contexte des études

Les différentes études ont été menées dans les deux CHU du groupe hospitalier de Fann situés à Dakar, Sénégal. Le CHU de Fann dispose de 339 lits fonctionnels avec une moyenne de 7 200 admissions par an. Cet hôpital comprend les services suivants : urgences, pneumologie, neurologie, neurochirurgie, maladies infectieuses, chirurgie cardio-vasculaire thoracique. L'Hôpital pour enfants d'Albert Royer est l'hôpital de référence pour la prise en charge des enfants et est constitué de 120 lits avec une moyenne de 5 000 admissions par an. Ces deux hôpitaux disposent de laboratoires avec une activité de microbiologie, de bactériologie et de virologie.

2 Méthodologie des études

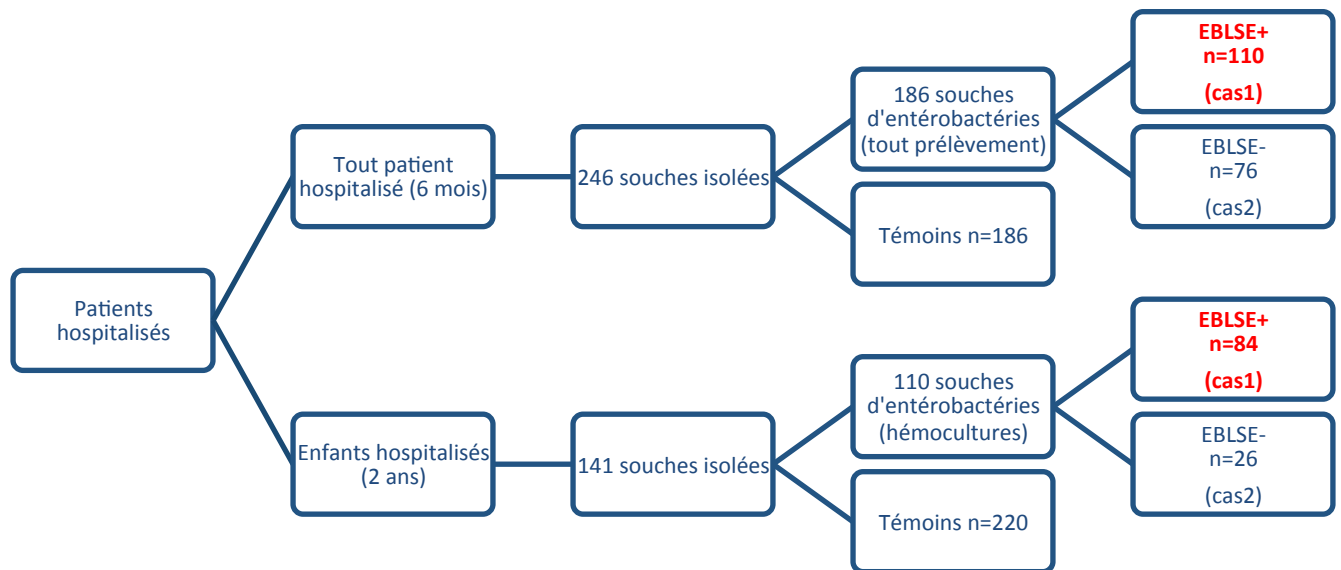
2.1 Populations d'études

Deux populations d'études ont été utilisées et étaient constituées des patients hospitalisés pour lesquels une entérobactérie était isolée des prélèvements à visée diagnostique réalisés en cas de suspicion d'infection (Figure 12). La population de l'étude 1 était constituée (à partir de la surveillance pilote) des patients (de tout âge) infectés par une entérobactérie isolée sur une période de 6 mois (d'avril à octobre 2012) dans les 2 hôpitaux. La population de l'étude 2 était constituée d'enfants hospitalisés ayant eu une bactériémie à entérobactérie isolée des hémocultures sur une période de 2 ans (de janvier 2012 à décembre 2013) dans l'hôpital pédiatrique.

Dans ces deux populations, les analyses suivantes ont été conduites :

- une analyse épidémiologique de type cas-témoins (avec une variante cas vs. cas) nichée dans la cohorte des patients hospitalisés ayant eu une entérobactérie isolée des prélèvements à visée diagnostique pour identifier les facteurs de risque d'acquisition d'une infection à EBLSE
- une analyse de cohorte rétrospective pour évaluer l'impact des EBLSE sur la mortalité
- une analyse médico-économique en utilisant un modèle multi-états pour évaluer l'allongement de la durée de séjour attribuable aux EBLSE et une analyse « cost-of-illness » pour évaluer le surcoût attribuable aux EBLSE.

Figure 12 : Populations des études



2.2 Définitions

Une infection est suspectée par le clinicien en présence de signes cliniques d'infection et est confirmée d'un point de vue bactériologique lorsqu'une souche bactérienne est isolée des prélèvements à visée diagnostique. Chez les enfants, une bactériémie est définie par l'isolement de bactéries des hémocultures réalisées en présence de fièvre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), d'hypothermie ($< 36^{\circ}\text{C}$) et d'autres signes cliniques détaillés dans les recommandations de la prise en charge des maladies infantiles dans les PED élaborées par l'OMS [73].

Un prélèvement bactériologique est réalisé en cas de suspicion d'infection avant l'initiation de toute antibiothérapie. L'infection est alors considérée comme acquise à l'hôpital si le prélèvement est réalisé au moins 48 heures après l'admission du patient (≥ 72 heures chez les nouveau-nés) et considérée comme acquise en communauté si le prélèvement est réalisé dans les 48 heures suivant l'admission (< 72 heures chez les nouveau-nés). Seules les infections à EBLSE acquises à l'hôpital ont été prises en compte dans les analyses. La date de survenue de l'infection était la date à laquelle les prélèvements contenant l'entérobactérie ont été réalisés. Lorsqu'une souche d'entérobactérie était isolée à plusieurs reprises le premier isolement de la souche était considéré.

2.3 Sélection des cas et des témoins

Les patients avec une infection causée par une entérobactérie étaient définis comme les cas et étaient répartis en deux groupes. Le premier groupe (cas 1) était les patients avec une infection causée par une entérobactérie productrice de BLSE (EBLSE+) et le deuxième groupe (cas 2) étaient les patients avec une infection causée par une entérobactérie non productrice de BLSE (EBLSE-). Les cas d'infections communautaires étaient exclus des études. Les témoins étaient des patients indemnes d'infection pendant la durée de leur hospitalisation pour lesquels aucune suspicion d'infection et de prescription d'antibiotiques n'étaient notifiées dans le dossier médical et aucun prélèvement à visée diagnostique réalisé. Ces témoins étaient sélectionnés de manière randomisée à partir de la base des données administratives des hospitalisations et l'absence de prélèvement à visée diagnostique vérifié à partir de la base de données des laboratoires. Pour chaque cas, un témoin dans l'étude 1 et 2 témoins dans l'étude 2 admis le même jour et dans le même service que le cas ont été sélectionnés.

2.4 Collecte des données

La première étape de la collecte des données consistait à extraire, à partir des bases de données au niveau des laboratoires, les données bactériologiques et administratives concernant les patients pour lesquels une entérobactérie était isolée des prélèvements à visée diagnostique réalisés en cas de suspicion d'infection. La deuxième étape consistait à recueillir les données cliniques relatives à ces cas d'infections à partir des dossiers médicaux à l'aide d'un questionnaire préétabli. Ce travail a été réalisé par deux internes en médecine. Pour chaque patient les variables suivantes ont été recueillies : sexe, âge, diagnostic établi à l'admission, comorbidités associées, interventions réalisées, présence de dispositifs invasifs telle que (cathéters urinaires, cathéters veineux-périphériques, ventilation mécanique,...) date de survenue de l'infection, type d'infection, prescriptions d'antibiotiques et mode de sortie de l'hôpital.

2.5 Définitions des indicateurs

Le **taux d'incidence des entérobactéries BLSE** est le nombre de souches d'entérobactéries BLSE isolées pendant la période de l'étude rapporté à 1 000 journées d'hospitalisation.

Le **taux de mortalité** est le nombre de décès associé aux infections sur 100 patients.

L' **allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE** est la différence de l'allongement de la durée séjour attribuable aux infections à EBLSE+ et celui attribuable aux infections à EBLSE- .

Le **coût d'une infection à EBLSE** est le coût des ressources mobilisées pour la prise en charge d'une infection à EBLSE à partir de la date de survenue de l'infection. Ce coût comprend celui du séjour hospitalier (lit d'hospitalisation), des examens de laboratoire réalisés et du traitement antibiotique.

Le **surcoût associé à la production de BLSE** est la différence entre le coût de la prise en charge d'une infection à EBLSE+ et celui de la prise en charge d'une infection à EBLSE- .

2.6 Détection des souches productrices de BLSE

L'identification des entérobactéries a été réalisée avec les galeries Api 20E (BioMérieux). La production de BLSE était déterminée en routine en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie en plaçant les disques de céfotaxime, de ceftazidime ou de céfépime à 30 mm d'un disque contenant de l'acide clavulanique [19].

2.7 Analyses statistiques

Le test exact de Fisher a été utilisé pour comparer les variables qualitatives et le test de Student pour comparer les variables quantitatives.

Pour identifier les facteurs de risque d'acquisition d'une infection à EBLSE, des modèles de régressions logistiques avec une méthode de sélection pas à pas descendante étaient testés et incluaient les variables avec une p-value inférieure à 0,20 dans les analyses univariées. Une p-value inférieure à 0,05 était considérée comme significative. Le type d'étude cas-cas-témoins a été choisi pour les avantages que présente la comparaison de 2 modèles multivariés. Le modèle 1 comparant les cas 1 au cas 2 permet d'évaluer les facteurs de risques d'acquérir le phénotype de résistance (production de BLSE) parmi des patients infectés. Le modèle 2 (cas 1 versus témoins) permet d'évaluer l'effet d'acquérir une infection à EBLSE parmi les patients hospitalisés. La comparaison des résultats de ces 2 modèles

permet par la suite d'identifier les facteurs de risque spécifiques à l'acquisition d'une infection à EBLSE.

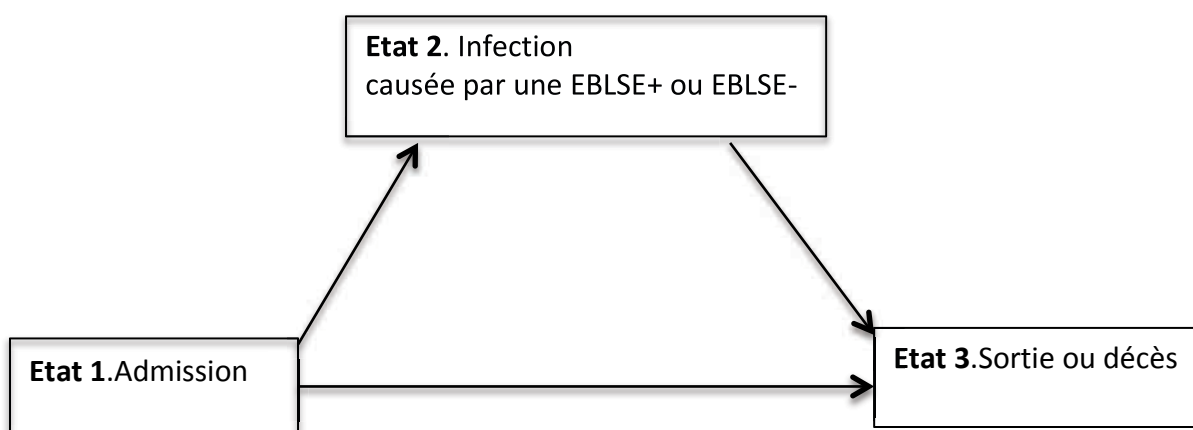
Des analyses de régression multivariées ont également été réalisées pour évaluer l'impact des EBLSE sur la mortalité et les facteurs de risques de décès chez les patients infectés. Les variables d'ajustement étaient principalement les comorbidités, l'exposition à des dispositifs invasifs, la durée de séjour avant la survenue de l'infection.

Les analyses statistiques étaient réalisées avec le logiciel STATA (version 13.0).

2.7.1 Modèle multi-états

L'allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE a été évalué en utilisant un modèle multi-états (multistate model-MSM) dans lequel la survenue de l'infection est modélisée comme une variable dépendante du temps. Les patients entrent dans le modèle à l'admission dans l'état 1 (Figure 13). Les patients se retrouvent dans l'état 2 à la date de survenue de l'infection (EBLSE+ ou EBLSE-) et dans l'état 3 considéré comme l'état absorbant à la date de sortie de l'hôpital ou à la date de décès. Les patients qui ne développent pas d'infection durant leur séjour hospitalier quittent l'état 1 pour aller directement dans l'état 3 sans passer par l'état 2 [74].

Figure 13 : Modèle multi-états utilisé pour estimer l'allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE



Le modèle multi-états permet de connaître le nombre de patients dans les différents états à un temps t de l'étude. Les probabilités de transition entre les différents états ont été

estimées de manière non paramétrique en utilisant l'estimateur d'Aalen-Johansen qui constitue une généralisation de l'estimateur de Kaplan-Meier [75]. La durée de séjour dans chaque état est calculée à partir de la matrice des probabilités de transitions. L'allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE est la différence de l'allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE+ et celle attribuable aux infections à EBLSE-. Pour estimer l'allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE+ les patients avec une infection à EBLSE+ étaient comparés aux patients non infectés durant tout leur séjour hospitalier et les patients infectés par une EBLSE- avant la date de survenue de l'infection. En effet, les patients infectés par une EBLSE- sont considérés comme non infectés jusqu'à la date de survenue de l'infection à partir de laquelle leurs données sont censurées. A l'inverse, pour estimer l'allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE-, les patients avec une infection à EBLSE+ étaient considérés comme des patients non infectés jusqu'à la survenue de l'infection date à laquelle leurs données sont censurées. Les analyses portant sur la durée de séjour ont été réalisées en utilisant les paquets `msm` et `etm` du logiciel R (version 2.15.3).

L'impact des infections à EBLSE+ et EBLSE- sur la durée de séjour a été évalué à l'aide de modèles à risques proportionnels de Cox en estimant le ratio de risque de sortie (décédé ou vivant) aussi appelé « hazard-ratio » (HR) de sortie de l'hôpital. Les variables d'ajustement étaient l'âge, le sexe, les comorbidités telles que la malnutrition, la drépanocytose et les dispositifs invasifs tels que la ventilation mécanique.

2.7.2 Analyse de type « cost-of-illness »

Une analyse économique de type « cost-of-illness (COI) » a été menée pour évaluer le surcoût attribuable à la production de BLSE. Le coût de la prise en charge d'une infection à BLSE+ et EBLSE- a été évalué en adoptant la perspective du patient. Seuls les coûts médicaux directs supportés par le patient à partir de la date de survenue de l'infection ont été mesurés. Les coûts médicaux indirects tels que la perte de salaire lié au décès ou aux jours de travail d'absence n'ont pas été pris en compte. Le coût de la prise en charge d'une infection à entérobactérie (EBLSE+ et EBLSE-) est constitué des coûts du séjour hospitalier, des examens de laboratoire et des antibiotiques prescrits. Le coût du séjour hospitalier était obtenu en multipliant l'allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE estimé par le modèle multi-états par le tarif journalier du lit d'hospitalisation. Pour

estimer le coût des examens de laboratoire réalisé, le forfait tarifaire appliqué dans l'hôpital a été considéré. En effet, dans les 2 hôpitaux un tarif unique est appliqué pour tous les examens de laboratoires réalisés chez un patient quelque soit leurs natures et leurs nombres. Pour estimer le coût des antibiotiques prescrits pour traiter l'infection, les données concernant le dosage et la durée de prescription de chaque antibiotique ont été recueillies à partir des dossiers médicaux des patients. Le prix des antibiotiques variait selon que le médicament était acheté dans la pharmacie interne de l'hôpital dans laquelle les médicaments sont subventionnés ou dans une pharmacie privée externe à l'hôpital.

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET PRESENTATION DES TRAVAUX

1 Epidémiologie et impact médico-économique des infections à EBLSE chez les patients hospitalisés (Etude 1)

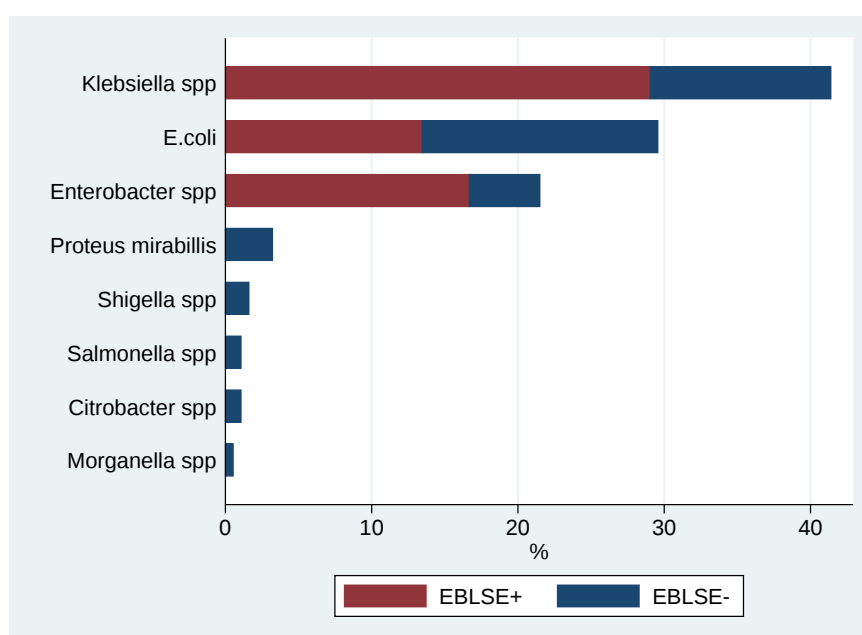
Titre de l'article 1: Infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* : clinical and economic impact in patients hospitalized in two teaching hospitals in Senegal (Annexe 2)

Cette première étude portait sur les 186 souches d'entérobactéries isolées dans le cadre d'une étude pilote portant sur l'ensemble des souches bactériennes isolées sur une période 6 mois et associées à des infections acquises dans les deux hôpitaux d'étude (Annexe 1).

1.1 Description des souches d'entérobactéries isolées

Parmi les souches d'entérobactéries isolées 59,1% étaient productrices de BLSE. Ces souches de BLSE (n=110) étaient produites par les *Klebsiella spp* (49.1%), les *Enterobacter spp* (28,2%) et les *E.coli* (22,7%) (Figure 14).

Figure 14 : Distribution des souches d'entérobactéries isolées et proportion de souches productrices de BLSE par espèce (N=186)

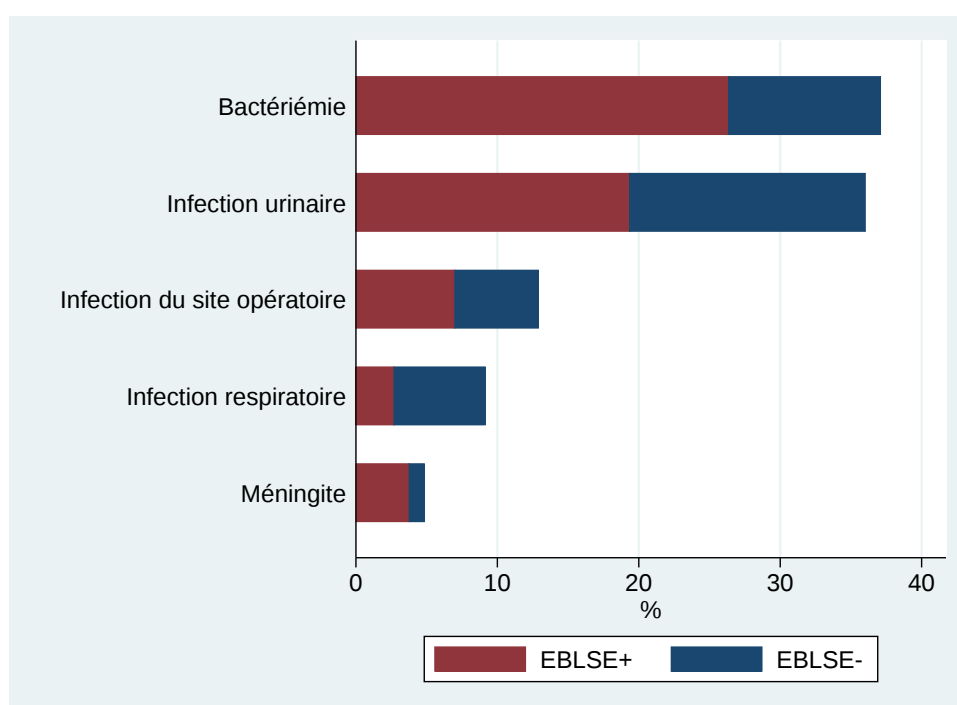


NOTE : Les pourcentages du graphique ont été calculés sur l'ensemble des souches d'Entérobactéries isolées (n=186). Par exemple : les *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE représentaient 29% des souches isolées.

Les résultats des antibiogrammes ont révélés que les souches productrices de BLSE étaient également résistantes à l'association sulfaméthoxazole/triméthoprine (95%), à la gentamicine (82%), à la ciprofloxacine (70%) et à l'amikacine (40%). Par contre toutes les souches BLSE étaient sensibles à l'imipénème.

Parmi les cas d'infections, 26,3% étaient des bactériémies à EBLSE et 19,3% des infections urinaires à EBLSE (Figure 15).

Figure 15: Types d'infections associées aux souches d'entérobactéries isolées des prélèvements à visée diagnostique (N=186)



1.2 Caractéristiques des patients inclus dans l'étude 1

La population de l'étude 1 (N=372 patients) était constituée de 110 patients avaient une infection à EBLSE+ (cas 1), 76 patients avec une infection à EBLSE- (cas 2) et 186 patients n'ayant pas eu d'infection pendant leur séjour hospitalier (témoins).

Le taux d'incidence des infections à EBLSE était de 3 cas /1 000 journées d'hospitalisations (JH) (95% CI : 2,4-3,5/1 000 JH).

Le taux d'incidence des bactériémies à EBLSE était de 1,8 cas/1 000 JH en pédiatrie (IC 95% : 1,5-2,5 cas/1000 JH) et de 6,4 cas /1 000 JH en néonatalogie (95 IC : 5,8-7,5 cas/1000 JH).

Les cas et les témoins avaient une moyenne d'âge similaire 27 ans (0-90 ans). Les patients de sexe masculin représentaient 46.2% des cas et 55,4% des témoins.

Parmi les 186 cas, 110 avaient une infection à EBLSE+ et 76 une infection à EBLSE- . La moyenne d'âge était similaire dans les deux groupes de patients (26,3 versus 28,1 ans ; $p=0,665$) (Table2). Parmi les infections néonatales ($n=26$), majoritairement des bactériémies, 84,6% étaient causées par une souche d'EBLSE. Les bactériémies à EBLSE+ étaient plus fréquentes que les bactériémies à EBLSE- (44,5 versus 26,3% ; $p=0,013$).

Les prescriptions empiriques d'antibiotiques considérées comme inappropriées étaient plus fréquentes parmi les infections à EBLSE+ que les infections à EBLSE- (88,2% versus 18,4% ; $p<0,001$). Par ailleurs la durée de séjour avant la survenue de l'infection était plus longue parmi les patients avec une infection à EBLSE+ que les patients avec une infection à EBLSE - (8,2 jours versus 4,8 jours ; $p=0,007$).

1.3 Facteurs de risques d'acquisition d'une infection à EBLSE

Le modèle 1 permet d'identifier les facteurs de risque d'acquisition du gène de résistance BLSE parmi les patients infectés et le modèle 2 les facteurs de risque d'acquisition d'une infection à EBLSE parmi les patients hospitalisés.

La comparaison des 2 analyses multivariées a révélé que les facteurs de risque spécifiques d'une infection à EBLSE étaient la présence de dispositifs invasifs tels que les cathéters urinaires (OR=4,4 ; 95%CI: 2,8-9,9 ; $p<0,0001$) et les cathéters veineux centraux (OR=5,2 ; 95%CI: 3,3-11,2 ; $p<0,0001$) (Table 3). Les nouveau-nés étaient également identifiés comme des patients à risque d'acquérir une infection à EBLSE (OR=6,3, 95%CI: 3,4-4,5 ; $p=0,023$).

Table 2: Facteurs associés à la production de BLSE (modèle 1) et aux infections à EBLSE (modèle 2): résultats des analyses univariées

Variable, n (%)	EBLSE+ (n=110)	EBLSE- (n=76)	Témoins (n=186)	P-value 1*	P-value 2**
Démographie					
Sexe masculin	68(61,8)	35(46,0)	86(46,2)	0,037	0,011
Age moyen, ans (min-max)	26,3(0-90)	28,1(0-90)	27(0-90)	0,665	0,414
Nouveau-né (0-28 jours)	22(20,0)	4(5,3)	26(13,9)	0,005	0,193
Prématuré	12(10,9)	2(2,6)	8(4,3)	0,046	0,033
Enfant (1 mois-16 ans)	37(33,6)	34(44,7)	71(38,2)	0,167	0,456
Adulte (>16 ans)	51(46,4)	38(50,0)	89(47,8)	0,656	0,811
Comorbidité					
Drépanocytose	10(9,1)	7(9,2)	12(6,4)	1	0,492
Malnutrition	10(9,1)	7(9,2)	18(9,7)	1	1
SIDA	8(7,2)	2(2,6)	9(4,8)	0,203	0,441
Diagnostic à l'admission					
Paludisme grave	19(17,3)	7(9,2)	17(9,1)	0,808	0,044
Gastroentérite	16(14,5)	9(11,8)	21(11,3)	0,666	0,468
Pathologies respiratoires	25(22,7)	10(9,1)	15(8,1)	0,127	0,0007
Pathologies neurologiques	20(18,2)	12(15,8)	38(20,4)	0,698	0,762
Méningite	10(9,1)	5(4,5)	4(2,1)	0,596	0,009
Tuberculose	3(2,7)	3(3,9)	11(5,9)	0,689	0,266
Cancer	10(9,1)	6(7,9)	3(1,6)	1	0,005
Procédure invasive					
Intervention chirurgicale	18(16,4)	18(23,7)	36(19,3)	0,258	0,641
Nutrition parentérale	24(21,8)	6(7,9)	12(6,4)	0,014	0,0002
Ventilation mécanique	38(34,5)	7(9,2)	8(4,3)	<0,0001	<0,0001
Cathéter veineux central	84(76,4)	35(46,0)	75(40,3)	<0,0001	<0,0001
Cathéter urinaire	37(33,6)	13(17,1)	24(12,9)	0,018	<0,0001
Type d'infection					
Bactériémie	49(44,5)	20(26,3)		0,013	
Infection urinaire	36(32,7)	31(40,8)		0,279	
Prescription empirique ATB inappropriée					
Durée moyenne de séjour, jour(ICà95%)					
Totale	22,6(20,3-24,9)	14(11,9-16,2)		<0,0001	
Avant infection	8,2 (6,4-9,9)	4,8(2,7-6,9)		0,007	
Après infection	14,2 (12,6-16,3)	9,3(7,4-11,1)		<0,0001	

ATB : antibiotique

* Modèle 1 : patients avec une infection à EBLSE+ versus infection à EBLSE-

**Modèle 2 : patients avec infection à EBLSE+ versus patients non infectés

Table 3 Facteurs de risque d'acquisition de la résistance BLSE (modèle 1) et d'une infection à EBLSE (modèle 2) : résultats des analyses multivariées

Variables	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 1		Modèle 2			
	Initial	Initial	Final		Final			
	P-value	P-value	OR	IC 95%	P-value	OR	IC 95%	P-value
Nouveau-né	0,005	0,193	2,8	1,8-6,4	<0,0001	6,3	3,4-4,5	0,023
Prématuré	0,046	0,033	-	-	-	-	-	-
Cancer	-	0,005	-	-	-	4,2	0,9-5,8	0,053
Pathologies respiratoires	0,127	0,0007	-	-	-	6,6	3,2-8,2	0,034
Nutrition parentérale	0,014	0,0002	5,3	0,9-6,4	0,056	-	-	-
Ventilation mécanique	<0,0001	<0,0001	4,9	0,8-6,3	0,050	2,8	2,1-5,3	<0,0001
Cathéter veineux central	<0,0001	<0,0001	4,9	2,9-17,8	0,007	5,2	3,3-11,2	<0,0001
Cathéter urinaire	0,018	<0,0001	4,1	2,7-16,3	0,006	4,4	2,8-9,9	<0,0001
Bactériémie	0,013	-	5,1	3,6-11,6	0,007	-	-	-

Modèle 1: patient avec une infection à EBLSE+ versus infection à EBLSE-

Modèle 2: patient avec une infection à EBLSE+ versus patients non infectés

1.4 Impact clinique de la production de BLSE sur la mortalité

Le taux de mortalité parmi les infections à entérobactérie était de 37%. Ce taux était significativement plus élevé parmi les infections à EBLSE+ que les infections à EBLSE- (47,3% versus 22,4% ; $p=0,0006$). Cet impact reste significatif après ajustement sur les facteurs de confusion (OR=6,6 ; IC à 95% :3,4-96,3 ; $p=0,036$). Par ailleurs, les résultats de l'analyse multivariée ont montré que la production de BLSE était un facteur de risque indépendant de la mortalité (OR=5,3 ; 95%CI: 3,1-19,9 ; $p=0,008$).

L'analyse multivariée a également montré que le recours à une ventilation mécanique était un facteur de risque de mortalité (OR= 6,1 ; 95%CI: 3,1-124,6 ; $p=0,040$). De plus, les nouveau-nés et les patients souffrant d'affections lourdes telles que la méningite ou le cancer étaient identifiés comme un groupe de patients avec une forte probabilité de décès (Table 4).

Table 4 Facteurs de risque de décès chez les patients hospitalisés: résultats des analyses uni et multivariées

Variable, n (%)	Décès		Analyse univariée			Analyse multivariée*		
	Oui (n=69)	Non (n=117)	OR	IC 95%	P-value	OR	IC 95%	P-value
Démographie								
Sexe masculin	34(49,3)	49(41,9)	1,3	0,7-2,4	0,361			
Age moyen,(min-max)	27,1(20,4-33,8)	26,9(21,6-32,3)			0,489			
Nouveau-né	16(23,2)	10(8,5)	3,2	1,4-7,5	0,008	4,5	2,4-37,8	0,025
Prématuré	9(13,0)	5(4,3)	3,4	1,1-9,9	0,042			
Comorbidités								
Drépanocytose	6(8,7)	11(0,5)	0,5	0,3-2,5	1			
Malnutrition	4(5,8)	13(11,1)	0,5	0,5-1,5	0,296			
SIDA	3(4,3)	7(5,9)	0,7	0,2-2,6	0,747			
Diagnostic à admission								
Paludisme grave	0(0)	19(16,2)	0,8	0,4-1,9	<0,0001			
Gastroentérite	6(8,7)	19(16,2)	0,5	0,2-1,3	0,184			
Pathologies respiratoires	18(26,1)	17(14,5)	2,1	0,9-4,3	0,079			
Méningite	11(15,9)	4(3,4)	5,3	1,7-16,6	0,004	2,3	1,5-4,9	<0,0001
Tuberculose	2(2,8)	4(3,4)	0,8	0-4,1	1			
Cancer	12(20,3)	4(3,4)	5,9	1,9-18,3	0,002	2,7	1,6-6,6	0,001
Pathologies neurologiques	8(11,5)	24(20,5)	0,5	0,2-1,2	0,159			
Invasive procédure								
Intervention chirurgicale	15(21,7)	21(17,9)	1,3	0,6-2,6	0,567			
Nutrition parentérale	15(21,7)	15(12,8)	1,9	0,9-4,1	0,148			
Ventilation mécanique	28(40,5)	17(14,5)	3,9	1,9-7,9	0,0002	6,1	3,1-124,6	0,040
Cathéter veineux central	53(76,8)	66(56,4)	2,6	1,3-4,9	0,007			
Cathéter urinaire	14(20,3)	36(30,8)	0,6	0,3-1,1	0,128			
Production de BLSE	52(75,4)	58(49,6)	3,1	1,6-5,9	<0,0001	5,3	3,1-19,9	0,008
Type d'infection								
Bactériémie	30(40,5)	39(33,3)	1,6	0,8-2,9	0,209			
Infection urinaire	18(26,1)	49(41,9)	0,5	0,2-0,9	0,039			
Prescription empirique ATB inadéquat	49(71,0)	62(52,9)			0,013			
Durée de séjour avant infection, jours (IC à95%)	5,9(4,3-7,5)	7,3(5,4-9,3)			0,838			

ATB : antibiotique

1.5 Impact clinique de la production de BLSE sur la durée de séjour

La durée moyenne de séjour était de 22,6 jours chez les patients avec une infection à EBLSE+ et de 14 jours chez les patients avec une infection à EBLSE- ($p < 0,0001$) (Table 2). La durée de séjour après la survenue de l'infection était plus longue dans le cas des infections à EBLSE+ que dans le cas des infections à EBLSE- (14,2 versus 9,3 jours ; $p < 0,0001$).

Les résultats du modèle multi-états ont révélé un allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE+ de 7,9 jours et de 3,9 jours pour les infections à EBLSE-. La prolongation de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE était donc de 4 jours (95%IC : 3,8 - 4,6 jours) (Table 5).

Le modèle de Cox a montré que les infections à EBLSE+ étaient associées de façon significative à une réduction du risque de sortie après ajustement sur les facteurs de confusion (HR : 0,32 ; IC à 95% : 0,24 – 0,42) augmentant par conséquent la durée de séjour.

Table 5 : Allongement de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE et hazard-ratio (HR) de sortie associé aux infections à EBLSE+ et EBLSE-

	Allongement de la durée de séjour (IC à 95%)	HR de sortie	
		Analyse univariée (IC à 95%)	Analyse multivariée (IC à 95%)
^a Infection à EBLSE+	7,9 (7,6-9,2)	0,29 (0,23-0,38)	0,32 (0,24-0,42)
^b Infection à EBLSE -	3.9 (3,8-4,6)	0,97 (0,75-1,24)	0,92 (0,71-1,20)

HR de sortie : risque de sortie

^a : Allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE+

110 patients avec une infection à EBLSE+ versus 76 patients avec une infection à EBLSE- censurés à la date d'infection et 186 patients non infectés

^b : Allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE-

76 patients avec une infection à EBLSE- versus 110 patients avec une infection à EBLSE+ censurés à la date d'infection et 186 patients non infectés

1.6 Impact économique attribuable à la production de BLSE

Le coût moyen de la prise en charge d'une infection EBLSE+ était significativement plus élevé que celui d'une infection à EBLSE- (215€ versus 115€, $p < 0,0001$) entraînant un surcoût attribuable à la production de BLSE de 100€ (Table 6).

Le séjour hospitalier et les prescriptions d'antibiotiques représentaient respectivement 60% et 40% de ce surcoût.

Table 6 : Coûts moyens associées à la prise en charge d'une infection à EBLSE+ et d'une infection à EBLSE- et surcoût attribuable à la production de BLSE

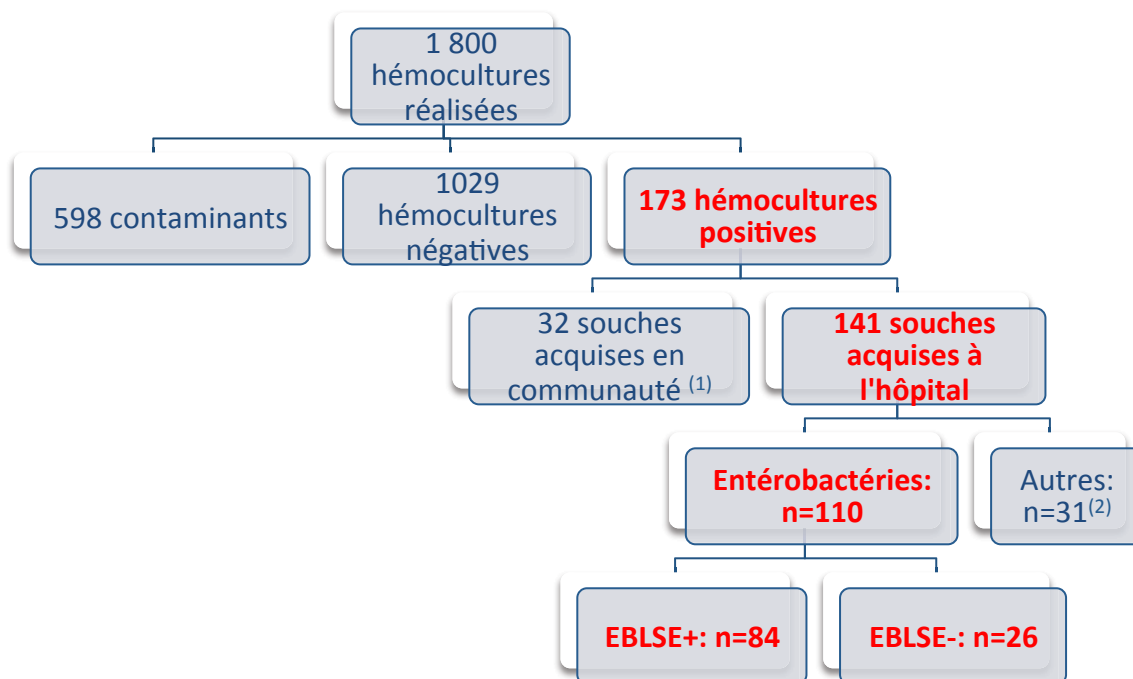
Variable (en €)	Infection à EBLSE+ (IC à 95%)	Infection à EBLSE- (IC à 95%)	Surcoût attribuable aux EBLSE (IC à 95%)	P-value
Coût de l'antibiothérapie	70	30	40	0.002
Coût du séjour	120	60	60	<0.0001
Coût des examens de laboratoire	25	25	-	-
Coût total (IC à 95%)	215(196-233)	115(103-125)	100 (78-125)	<0.0001

2 Epidémiologie et impact clinique des bactériémies à EBLSE chez les enfants hospitalisés (Etude 2)

Titre de l'article 2 : Epidemiology and burden of bloodstream infection caused by Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in a pediatric hospital in Senegal (Annexe 3)

Durant les 2 ans de l'étude, 173 souches bactériennes ont été isolées de 1800 hémocultures réalisées, soit un taux d'hémocultures positives de 10% (Figure 16). Des contaminants ont été retrouvés dans 36,8% des hémocultures. Parmi les bactériémies acquises à l'hôpital (n=141), 110 (78,1%) étaient causées par une souche d'entérobactérie dont 84 (76,4%) étaient productrice de BLSE. Les souches productrices de BLSE (n=84) étaient les *Enterobacter* spp (52,4%), les *Klebsiella* spp (38,1%) et les *E.coli* (9,5%) (Figure 17). Les souches d'*Enterobacter* spp étaient principalement productrices de BLSE (88%).

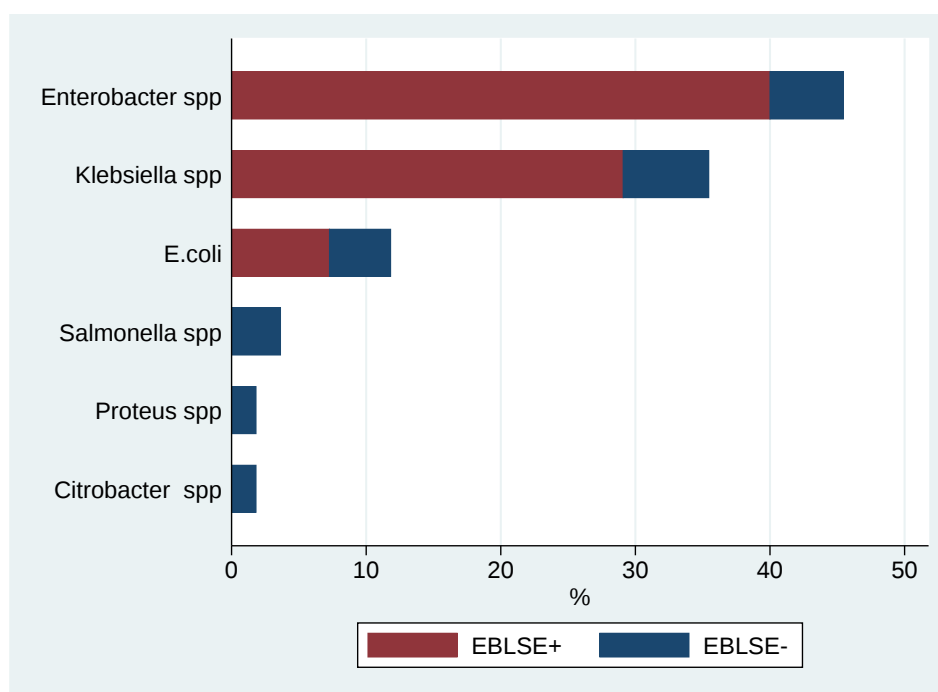
Figure 16 : Flow chart de l'étude 2



(1) : Souches impliquées dans les infections communautaires : Entérobactérie (21) dont 12 EBLSE, *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Staphylococcus* spp (6), *Streptococcus* spp (3)

(2) : Autres souches impliquées dans les infections associées aux soins : *Pseudomonas aeruginosa* (6), *Staphylococcus aureus* (22) dont 2 SARM, *Streptococcus* spp (3)

Figure 17 : Distribution des souches d'entérobactéries et proportion de souches productrices de BLSE selon l'espèce (N=110)



NOTE : Les pourcentages du graphique ont été calculés sur l'ensemble des souches d'Entérobactéries isolées (n=110). Par exemple : les *Enterobacter spp* productrices de BLSE représentaient 40% des souches isolées.

2.1 Caractéristiques des patients inclus dans l'étude 2

La population de l'étude 2 (n=330 patients) était constituée de 84 patients avec une bactériémie EBLSE+ (cas1), 26 patients avec une bactériémie EBLSE- (cas2) et 220 patients non infectés (témoins).

Le taux d'incidence des bactériémies à EBLSE était de 1,5 cas/1 000 JH (IC à 95% : 1,2 – 5,6 cas /1 000 JH).

Les cas 1 étaient plus jeunes que les cas 2 (2,5 ans versus 4,4 ans; p=0,021) ou les témoins (2,5 ans versus 3,7 ans ; p=0,016) (Table 7). Les bactériémies néonatales (n=29) étaient majoritairement causées par les EBLSE+ (93,1%).

Les prescriptions empiriques d'antibiotiques considérées comme inappropriées étaient plus fréquentes parmi les infections à EBLSE+ que les infections à EBLSE- (97,6% versus 19,2% ; p=0,004). Par ailleurs la durée de séjour avant la survenue de l'infection était

significativement plus longue chez les patients avec une infection à EBLSE+ que ceux avec une infection à EBLSE- (8,3 versus 5,5 jours ; $p=0,035$) (Table 7).

Table 7: Facteurs associés à la production de BLSE et aux bactériémies à EBLSE: résultats des analyses univariées

Variable, n (%)	BLSE+ (n=84)	BLSE – (n=26)	Témoins (n=220)	P-value 1*	P-value 2**
Démographiques					
Sexe, Masculin	44(52,4)	14(53,8)	111(50,4)	1	0,798
Age moyen, années	2,5	4,4	3,7	0,021	0,016
Nouveau-né	27(32,1)	2(7,7)	48(21,9)	0,012	0,074
Prématuré	7(8,3)	2(7,7)	4(1,8)	0,719	0,012
Comorbidités					
Drépanocytose	28(33,3)	3(11,5)	7(3,2)	0,044	<0,0001
Malnutrition	32(38,1)	4(15,4)	9(4,1)	0,034	<0,0001
Anémie sévère	16(19,0)	8(30,8)	31(14,1)	0,276	0,291
Diagnostic à l'admission					
Paludisme grave	11(13,1)	4(15,4)	34(15,4)	0,750	0,719
Gastroentérite	4(4,8)	8(30,8)	65(29,5)	0,0009	<0,0001
Pathologies respiratoires	25(29,8)	8(30,8)	40(18,2)	1	0,041
Maladies cardiovasculaires	3(3,5)	1(3,8)	4(1,8)	1	0,399
Méningite	5(5,9)	1(3,8)	7(3,2)	1	0,323
Pathologies ORL	10(11,9)	3(11,5)	24(10,9)	1	0,839
Procédure invasive					
Intervention chirurgicale	15(17,8)	5(19,2)	36(16,4)	1	0,734
Nutrition parentérale	24(28,6)	10(38,5)	22(10,0)	0,343	<0,0001
Ventilation mécanique	53(63,1)	10(38,5)	32(14,5)	0,040	<0,0001
Cathéter veineux central	45(53,6)	11(42,3)	16(7,3)	0,373	<0,0001
Transfusion sanguine	16(19,0)	3(11,5)	12(5,5)	0,554	0,0006
Prescription ATB empirique inappropriée	82(97,6)	5(19,2)		<0,0001	
Durée de séjour					
Total	22,5(18,5-26,5)	12,6(9,5-15,8)		0,004	
Avant infection	8,3(7,2-6,7)	5,5(3,9-7,1)		0,035	
Après infection	14,2(11,1-17,4)	7,1(5,1-9,1)		0,008	

^a Modèle 1 : patients avec une bactériémie à EBLSE+ versus bactériémie à EBLSE-

^b Modèle 2 : patients avec une bactériémie à EBLSE+ versus patients non infectés

2.2 Facteurs de risques d'acquisition d'une bactériémie à EBLSE

La comparaison des résultats des 2 analyses multivariées ont montrés que la ventilation mécanique (OR=3,5; IC à 95%: 2,7-5,3; p<0,0001) était un facteur de risque spécifique d'acquérir une bactériémie à EBLSE. Les nouveau-nés (OR=11,4; IC à 95%: 5,7-198; p=0,041), les patients drépanocytaires (OR=3,1; IC à 95%:2,3-4,9; p<0,0001) et malnutris (OR=2,0; IC à 95%: 1,7-2,6; p<0,0001) étaient également identifiés un groupe de patients à risque d'acquérir une bactériémie à EBLSE (Table 8).

Table 8: Facteurs de risques d'acquisition de la résistance BLSE (modèle 1) et d'une bactériémie à EBLSE (modèle 2): résultats des analyses multivariées

Variable	Modèle initial 1	Modèle Initial 2	Modèle final 1			Modèle final 2		
	P-value	P-value	OR	IC à 95%	P-value	OR	IC à 95%	P-value
Nouveau-né	0,012	0,074	2,8	1,9-60,0	<0.0001	11,4	5,7-198	0,041
Prématuré	-	0,012	-	-	-	4,7	2,5-41,8	0,027
Drépanocytose	0,044	<0,0001	3,8	2,3-10,3	0.002	3,1	2,3-4,9	<0,0001
Malnutrition	0,034	<0,0001	2,8	1,9-5,3	<0.0001	2,0	1,7-2,6	<0,0001
Nutrition parentérale	-	<0,0001	-	-	-	9,6	4,9-98,0	0,039
Ventilation mécanique	0,025	<0,0001	6,1	3,1-228,9	0.044	3,5	2,7-5,3	<0,0001
Cathéter veineux central	0,170	<0,0001				4,0	2,9-6,7	<0,0001
Transfusion sanguine	0,149	0,0006						

Modèle 1: patients avec une bactériémie à EBLSE+ versus bactériémie à EBLSE-

Modèle 2: patients avec une bactériémie à EBLSE+ versus patients non infectés

2.3 Impact clinique de la production de BLSE sur la mortalité

Le taux de mortalité parmi les patients ayant eu une bactériémie était de 45,5%. Le taux de mortalité était significativement plus élevé parmi les bactériémies EBLSE+ que les bactériémies EBLSE- (54,8% versus 15,4% ; p<0,0001).

La production de BLSE était identifiée comme l'unique facteur de risque de décès chez les patients ayant une bactériémie (OR= 2,9; IC à 95% : 1,8-7,3; p=0,001) (Table 9).

Table 9: Facteurs associés à la mortalité chez les patients hospitalisés: résultats des analyses uni et multivariées

Variable, n (%)	Décès		Analyse univariée			Analyse multivariée*		
	Oui	Non	OR	IC à 95%	P value	OR	IC à 95%	P value
	(n=50)	(n=60)						
Démographie								
Masculin	24(48,0)	28(46,7)	1,1	0,5-2,2	1			
Age moyen, années	1,5	4,2			0,0003			
Nouveau-né	19(38,0)	10(16,7)	3,1	1,3-7,3	0,016			
Prématuré	6(12,0)	3(5,0)	2,6	0,7-9,9	0,295			
Comorbidité								
Drépanocytose	13(26,0)	18(30,0)	0,8	0,3-1,9	0,676			
Malnutrition	18(36,0)	18(30,0)	1,3	0,6-2,9	0,545			
Anémie sévère	10(20,0)	14(23,3)	0,8	0,3-2,0	0,817			
Diagnostic à l'admission								
Paludisme grave	7(14,0)	8(13,3)	1,1	0,4-3,1	1			
Gastroentérite	1(2,0)	11(18,3)	0,1	0-0,6	0,006			
Pathologies respiratoires	19(38,0)	14(23,3)	2,0	0,9-4,6	0,101	3,0	1,4-17,6	0,093
Pathologies cardiovasculaires	2(4,0)	2(3,3)	1,2	0,2-7,1	1			
Méningite	5(10,0)	1(1,7)	6,5	0,9-1,2	0,090			
Pathologies ORL	6(12,0)	7(11,7)	1,0	0,3-3,1	1			
Procédure invasive								
Intervention chirurgicale	7(14,0)	13(21,7)	0,6	0,2-1,6	0,332			
Nutrition parentérale	12(24,0)	22(36,7)	0,5	0,2-1,2	0,214			
Ventilation mécanique	35(70,0)	28(46,7)	2,7	1,2-5,8	0,019	6,5	2,9-34,4	0,098
Cathéter veineux central	27(54,0)	29(48,3)	1,2	0,5-2,6	0,572			
Transfusion sanguine	9(18,0)	10(16,7)	1,1	0,4-2,9	1			
Production de BLSE	46(92)	38(63,3)	6,6	2,2-20,0	0,0006	2,9	1,8-7,3	0,001
Antibiothérapie empirique inadéquate	46(92)	41(68,3)	5,3	1,7-16,1	0,002			

2.4 Impact clinique de la production de BLSE sur la durée de séjour

La durée moyenne de séjour des patients avec une bactériémie à EBLSE+ était supérieure à celle des patients avec une bactériémie à EBLSE- (22,5 jours vs 12,6 jours, $p < 0,0001$). La durée de séjour après la survenue de l'infection était plus longue chez les patients avec une bactériémie à EBLSE+ que ceux avec une bactériémie à EBLSE- (14,2 versus 7,1 jours ; $p = 0,008$) (Table 7).

Les résultats des modèles multi-états ont montré une prolongation de la durée de séjour attribuable à la production de BLSE de 4,3 jours.

Le modèle de Cox a indiqué après ajustement sur les variables de confusion que les infections à EBLSE+ et à EBLSE- étaient associées à une réduction du risque de sortie de l'hôpital (Table 10).

Table 10: Allongement de la durée de séjour et hazard-ratio (HR) de sortie associés aux bactériémies à EBLSE+ et à EBLSE-

	Allongement de la durée de séjour (IC à 95%)	HR de sortie	
		Analyse univariée (IC à 95%)	Analyse multivariée (IC à 95%)
^a Infection à EBLSE+	5,1 (3,8-5,6)	0,18 (0,13-0,24)	0,07 (0,04-0,12)
^b Infection à EBLSE -	0,8 (0,7-1)	0,66 (0,44-0,99)	0,12 (0,07-0,21)

^a : Allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE+
84 patients avec une infection à EBLSE+ versus 26 patients avec une infection à EBLSE- censurés à la date d'infection et 220 patients non infectés

^b : Allongement de la durée de séjour attribuable aux infections à EBLSE-
26 patients avec une infection à EBLSE- versus 84 patients avec une infection à EBLSE+ censurés à la date d'infection et 220 patients non infectés

2.5 Impact clinique des prescriptions empiriques inappropriées

Les prescriptions empiriques d'antibiotiques, principalement des C3G, étaient inappropriées pour traiter 87% des cas de bactériémies. Les patients ayant reçus une prescription empirique inappropriée avaient une durée de séjour plus longue (22,9 versus 14,2 jours, $p = 0,003$) et un taux de mortalité plus élevé (92% versus 8% ; $p = 0,0019$) que ceux ayant eu un traitement empirique approprié.

3 Synthèse des résultats des 2 études

Table 11 : Synthèse des résultats présentés dans les 2 études

	ETUDE 1	ETUDE 2
Population	Patients hospitalisés dans les hôpitaux de l'étude	Enfants hospitalisés dans l'hôpital pédiatrique
Durée de l'étude	6 mois	2 ans
Type d'infection	Tout type d'infection	Bactériémie
Proportion de souches BLSE, n (%)	110(59,1)	84(76,4)
Espèces productrices de BLSE, n (%)	Klebsiella spp : 54(49,1) Enterobacter spp : 31 (28,2) E.coli : 25 (22,7)	Enterobacter spp :44(52,4) Klebsiella spp :32(38) E.coli :8 (9,5)
Taux d'incidence des infections BLSE	3 cas / 1 000 JH	1,5 cas / 1 000 JH
Facteurs de risques d'acquisition d'infections à EBLSE	Cathéter veineux central Cathéter urinaire	Ventilation mécanique
Groupes de patients à risque d'acquérir une infection BLSE	Nouveau-nés	Nouveau-nés Enfants drépanocytaires/malnutris
Taux de mortalité parmi les patients infectés	37%	45,5%
Facteurs de risque de décès	Production de BLSE Ventilation mécanique Nouveau-né Méningite et cancer	Production de BLSE
Prescriptions empiriques d'antibiotiques inappropriées	88,2% vs 18,4% (p<0,0001)	92% versus 68,3% (p=0,002)
Impact clinique et économique de la production de BLSE		
Augmentation du taux de mortalité (EBLSE+ vs EBLSE-)	47,3% vs 22,4% (p=0,0006) ↑de 24,9%	54,8% vs 15,4% (p<0,0001) ↑ de 39,4%
Augmentation de la durée de séjour (EBLSE+ vs EBLSE-)	7,9 jours vs 3,9 jours ↑de 4 jours	5,1 jours vs 0,8 jours ↑de 4,3 jours
Impact financier des infections BLSE (EBLSE+ vs EBLSE-)	215€ vs 115€ ↑de 100€	Pas évalué

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Le taux d'incidence des infections causées par une EBLSE que nous avons estimé à 3/1 000 journées d'hospitalisation (JH) est environ 5 fois supérieur à celui estimé en France (0,55/1 000JH) à la même période [43]. L'épidémiologie des bactéries isolées dans les deux hôpitaux du Sénégal est similaire à celle décrite dans d'autres pays d'Afrique avec une dominance des *Klebsiella spp* parmi les espèces productrices de BLSE [54, 55, 76].

Parmi les cas de bactériémies observées en milieu pédiatrique, le taux d'incidence des bactériémies à EBLSE était de 1,5/1 000 JH. Les principales souches productrices de BLSE étaient les *Enterobacter spp* alors que les *E.coli* et les *Klebsiella pneumoniae* étaient fréquemment reportées dans d'autres pays en Afrique [76-78]. Si l'épidémiologie des bactériémies survenant chez les enfants hospitalisés a été décrite en Afrique par plusieurs auteurs, l'impact clinique des bactériémies multirésistantes a été très peu évalué. Notre étude semble être la seule avec celle de Blomberg menée en Tanzanie il y a 10 ans à évaluer les conséquences cliniques des bactériémies à EBLSE et à montrer un impact significatif de ces infections multirésistantes sur la mortalité [77]. Ces résultats devraient inciter les autorités de santé à considérer les bactériémies multirésistantes comme une cause majeure de décès chez les enfants de 0 à 5 ans au même titre que la pneumonie, la diarrhée et le paludisme [79]. Le taux élevé de mortalité associé aux bactériémies à EBLSE pourrait compromettre l'atteinte du quatrième objectif du millénaire pour le développement au Sénégal. En effet, le taux de mortalité infantile n'est passé que de 139 à 75 pour 1 000 naissances vivantes entre 1990 et 2010, l'objectif étant d'atteindre en 2015 un taux de mortalité de 44 pour 1 000 naissances vivantes [80]. Les résultats de la dernière enquête démographique et de santé (2013) suggèrent une sous-estimation du taux réel d'infections néonatales diagnostiquées au Sénégal. En effet, parmi les femmes ayant accouché à domicile 59% n'ont pas effectué une consultation post-natale et seules 45% des mères ont fréquenté une structure de santé en cas de fièvre observée chez le nouveau-né [65]. Des études plus poussées sont donc nécessaires pour avoir une meilleure estimation de l'incidence des infections bactériennes néonatales et évaluer l'impact réel des infections à BMR sur la mortalité chez les nouveau-nés qui constituent un groupe à risque élevé d'acquérir une infection à EBLSE ou de décéder.

L'évaluation économique que nous avons menée a révélé que le coût de la prise en charge d'une infection causée par une entérobactérie pouvait être considérable pour les patients. Le surcoût attribuable à la production de BLSE estimé à 100€ est plus élevé que le revenu moyen mensuel de 87€ au Sénégal où un tiers de la population vit avec moins de 1,25\$ par jour [62]. Ce coût serait encore plus élevé en cas de prescription de carbapénèmes durant 7 jours pour traiter une infection à EBLSE qui entraînerait un surcoût de 400€. Notre analyse économique a été réalisée selon la perspective du patient et non celle de l'hôpital ou d'un tiers payeur comme réalisé dans la plupart des études économiques. En effet, au Sénégal, les dépenses de santé sont constituées à 80% par les dépenses privées essentiellement financées par les paiements directs des ménages (95,3%) [81]. Ces dépenses de santé peuvent avoir de lourdes conséquences financières pour les familles pouvant même les conduire à une situation de pauvreté [82]. Une étude réalisée par Kruk et al. a montré que pour couvrir les frais de santé les ménages avaient souvent recours à des systèmes de "financement des périodes difficiles" qui pouvaient être des prêts obtenus de la famille ou d'amis ou la vente de biens personnels [83]. Dans cette étude, les auteurs ont montré que 37,8% des ménages sénégalais enquêtés avaient recours à ce système de financement.

Le gouvernement a récemment mis en place un programme de gratuité des soins pour les personnes âgées de moins de 5 ans et ceux âgés de plus de 60 ans avec un budget d'environ 4,5 millions €. En appliquant le taux d'incidence des infections à EBLSE à la population des bénéficiaires qui ont été hospitalisés au cours de l'année 2014, nous estimons que le coût total de la prise en charge des cas potentiels d'infections à EBLSE dans cette population serait de 5,7 millions € (IC à 95% : 5,2-6,3 millions €). Ce coût serait supérieur au budget annuel du programme et ne permettrait pas la prise en charge d'autres affections. Vu les conséquences financières dramatiques que pourraient représenter les infections à EBLSE, le gouvernement devrait d'avantage appuyer le PRONALIN pour mettre en œuvre des stratégies de lutte contre les BMR afin de réduire le taux d'incidence des infections BLSE et par conséquent le coût de leur prise en charge.

Le surcoût attribuable à la production de BLSE que nous avons estimé à 100€ peut paraître faible comparé aux montants reportés dans études menées dans les pays développés, variant de 5 000€ à 39 000€ [84-88]. Cette différence peut être expliquée par l'utilisation d'équipements médicaux modernes sophistiqués et coûteux dans les pays développés

comparé aux équipements obsolètes souvent retrouvés dans les hôpitaux des PED. De plus, les tarifs d'une journée d'hospitalisation semblent être plus élevés dans les pays développés que dans les PED comme au Sénégal où le tarif en vigueur dans les hôpitaux publics subventionnés par l'Etat est en moyenne de 10€ par jour. Les différences de coûts peuvent également être expliquées par la méthode utilisée dans l'analyse économique. En effet, Gandra et al. ont démontré que le coût de l'infection était surestimé si le groupe de témoin était constitué de patients n'ayant pas eu d'infection, si la survenue de l'infection était considérée comme une variable dépendante du temps et si les valeurs médianes étaient utilisées [89]. Nous avons évité ces biais en utilisant un modèle multi-états dans lequel le coût attribuable aux infections à EBLSE+ était comparé à celui attribuable aux infections à EBLSE-, en modélisant la survenue de l'infection comme une variable dépendante du temps et utilisant des valeurs moyennes. Par ailleurs, dans notre analyse économique, seuls les coûts médicaux directement supportés par le patient pour la prise en charge de l'infection ont été évalués. Les dépenses de santé liées à la pathologie ayant nécessité l'hospitalisation du patient n'ont donc pas été prises en compte. De plus, les coûts indirects tels que la perte de salaire liée aux jours d'absence à cause de la maladie n'ont pas été évalués.

Nos résultats ont également montré que la durée du séjour hospitalier avait un impact important sur le coût de la prise en charge d'une infection à EBLSE. En effet, nous avons montré, comme Lee et al. dans leur estimation du coût de la prise en charge d'une infection à EBLSE en Corée, que le coût du séjour hospitalier représentait au moins 50% du coût total d'une infection à EBLSE [85]. Nous avons également montré dans les 2 études que la production de BLSE était associée à une prolongation de la durée d'hospitalisation de 4 jours. Le modèle multi-états, de plus en plus utilisé, est considérée comme la méthode la plus appropriée pour évaluer l'allongement de la durée de séjour attribuable à la résistance bactérienne [90-92]. En effet, avec cette méthode la survenue de l'infection est considérée comme une variable d'exposition dépendante du temps permettant ainsi d'éviter les biais temps-dépendant inhérents aux méthodes statistiques classiques. Si la survenue de l'infection n'est pas prise en compte dans le modèle comme une variable dépendante du temps, son impact sur la durée de séjour et par conséquent sur le coût de l'hospitalisation est inévitablement surestimé [92- 95].

L'analyse cas-cas-témoins a permis d'identifier les facteurs de risque d'acquisition du gène de résistance BLSE parmi les patients infectés et les facteurs de risque d'acquisition

d'une infection à EBLSE parmi les patients hospitalisés. L'importance du choix du groupe contrôle a été largement décrit et dépend de la question de recherche posée par les investigateurs [96,97]. Il a également été démontré que la comparaison des patients infectés par une EBLSE+ et ceux infectés par une EBLSE- peut conduire à un biais de sélection puisque les patients avec une infection à EBLSE- n'ont pas la même fréquence d'exposition aux antibiotiques que les patients avec une infection à EBLSE+. Cette comparaison peut avoir un important impact sur l'estimation de l'effet de l'exposition à un antibiotique [96,98]. Cependant, puisque l'effet de l'exposition aux antibiotiques, décrite par plusieurs auteurs comme un facteur de risque d'acquisition d'une souche BLSE, n'a pas été évalué dans nos études nous pouvons considérer que la comparaison des cas1 aux cas2 ne conduit pas à un biais de sélection [87,88,99,100]. En effet, les données sur les prescriptions d'antibiotiques avant l'admission hospitalière étaient non reportées dans les dossiers médicaux des patients et donc n'ont pas pu être recueillies dans le cadre de nos études.

La comparaison des patients infectés par une EBLSE+ aux patients non infectés ne permet pas de différencier si la variable d'intérêt est un facteur de risque d'acquérir le gène de résistance ou un facteur de risque d'acquérir le germe indépendamment de sa sensibilité aux antibiotiques [101]. De ce fait les résultats du modèle 1 permettent d'identifier les facteurs de risque spécifiques aux infections à EBLSE. Ces facteurs de risque étaient liés aux soins et étaient l'utilisation de cathéters veineux centraux (OR :5,2 ; IC à 95% :3,3-11,2 ; $p<0,0001$), de cathéters urinaires (OR=4,4 ; IC à 95% :2,8-9,9 ; $p<0,0001$) comme démontré par plusieurs auteurs [85,87,88,102-104]. La ventilation mécanique a été identifiée comme un facteur de risque d'acquisition d'une bactériémie à EBLSE chez les enfants hospitalisés (OR=3,5 ; IC à 95% :2,7-5,3 ; $p<0,0001$). Les résultats des analyses multivariées ont également indiqué que les nouveau-nés étaient un groupe à risque élevé d'acquérir une infection à EBLSE (OR=6,3, IC à 95% :3,4-4,5 ; $p=0,023$) et d'acquérir une bactériémie à EBLSE (OR=11,4, IC à 95% :5,7-198 ; $p=0,041$). En effet, l'immaturation de leur système immunitaire et les mauvaises conditions d'hygiène pendant les accouchements les rendent vulnérables et pourraient augmenter le risque d'acquisition d'une infection. Les souches productrices de BLSE peuvent également être transmises par voie materno-fœtale. Cependant le lien entre ces mécanismes de transmission et la fréquence des infections à EBLSE reste à établir.

La malnutrition a été identifiée par Aiken et al. comme un facteur de risque d'acquisition d'une bactériémie chez les enfants hospitalisés au Kenya [105]. Dans notre étude, nous avons montré que les enfants présentant une malnutrition sévère étaient également à risque de développer une bactériémie à EBLSE. Il a été démontré qu'en altérant l'effet barrière du microbiote intestinal, la prise d'antibiotique chez les enfants malnutris fragilise leur système immunitaire et favorise l'installation et/ou la prolifération de BMR [106,107]. De plus, de nombreuses études ont montré qu'une utilisation d'antibiotiques avant l'admission hospitalière était un facteur d'acquisition d'une infection à EBLSE [28, 85, 87, 108]. De ce fait, les enfants malnutris souvent exposés aux antibiotiques sont à risque d'acquérir une infection à EBLSE au cours d'une hospitalisation comme le montrent les résultats de notre étude 2 et certains auteurs [68]. En effet, dans le cadre de la récupération nutritionnelle en ambulatoire, un traitement antibiotique (amoxicilline) est systématiquement prescrit aux enfants sévèrement malnutris. L'efficacité de l'association de cet antibiotique au traitement nutritif a été récemment démontrée dans une étude clinique menée au Malawi [109]. Cette étude a montré une réduction du taux d'échec du traitement nutritif de 24,4% et du taux de mortalité de 2,6% dans le groupe d'enfants traités avec de l'amoxicilline comparativement au groupe placebo. Malgré ces résultats prometteurs, cette prescription d'antibiotiques dans la prise en charge en ambulatoire des cas de malnutritions sévères, sans aucune infection sous-jacente, reste controversée. Recommander une telle pratique de prescription nécessite au préalable l'évaluation du rapport bénéfice-risque de son utilisation compte tenu de l'incidence alarmante des infections à EBLSE et de leur impact négatif décrit plus haut.

La fréquence élevée des souches productrices de BLSE et les facteurs de risques liés aux soins identifiés suggèrent un faible niveau d'hygiène dans les hôpitaux participant à nos études favorisant ainsi la dissémination des souches résistantes. En effet, pendant la période des études menées, une évaluation des pratiques et de la promotion de l'hygiène des mains en utilisant un outil élaboré par l'OMS [66] a révélé un niveau d'hygiène des mains basique dans les 2 hôpitaux défini par la présence de mesures mises en places mais qui ne satisfont pas aux normes. Pour limiter la transmission des germes, les précautions standard d'hygiène devraient être respectées tout au long des soins (lors de la pose des dispositifs invasifs) et plus particulièrement lors des soins dispensés aux nouveau-nés. Pour améliorer le niveau

d'hygiène des mains et ainsi réduire le taux d'incidence des souches multirésistantes, dans le contexte des pays à ressources limitées, l'OMS a mis en œuvre un programme de partenariats africains pour la sécurité des patients pour promouvoir l'usage des solutions hydro-alcooliques en aidant les hôpitaux à les fabriquer localement. Cette initiative de production locale à un coût réduit a été mise en place au Sénégal dans les 2 hôpitaux de nos études [110]. Par ailleurs, compte tenu du rôle important des excréta dans la diffusion des souches BLSE, un plan de gestion des excréta devrait être élaboré. Dans les PED, la famille souvent impliquée dans la prise en charge des patients devrait être informée sur les mesures d'hygiène à prendre lors de contact avec les excréta. De manière générale, l'information sur les risques de transmission des germes à l'hôpital et lors du retour à domicile ainsi que l'importance de l'hygiène des mains devraient être incluses dans la politique de prévention des infections à EBLSE.

Le taux élevé de souches productrices de BLSE remet également en question les stratégies de prescriptions empiriques d'antibiotiques reposant principalement sur les C3G inefficaces pour traiter les infections à EBLSE. Nous avons montré un taux élevé de prescriptions empiriques de C3G inappropriées pour traiter les cas d'infections à EBLSE+ (88,2%) et de bactériémies à EBLSE+ (92%). Nous avons montré comme certains auteurs qu'une prescription inappropriée augmentait le taux de décès et la durée de séjour des patients [111-114]. Par ailleurs, du fait de la multirésistance des souches productrices de BLSE, nos résultats montrent que l'association de l'ampicilline et de la gentamicine recommandée par l'OMS pour la prise charge des infections néonatales est souvent inefficace dans le traitement des infections à EBLSE [115]. Les prescriptions empiriques d'antibiotiques devraient être basées sur les données issues de manière régulière de la surveillance des bactéries les plus fréquemment isolées au niveau local et de leur profil de résistance [116]. Cependant, face aux options thérapeutiques efficaces limitées, les prescripteurs sont confrontés à un dilemme lors de l'initiation d'une antibiothérapie : minimiser la sélection des souches résistantes et donc réduire l'utilisation empirique des C3G ou maximiser les résultats cliniques individuels en prescrivant les C3G.

Nos résultats suggèrent de réduire l'utilisation empirique des C3G, accessibles à bas prix dans les pharmacies internes des hôpitaux. Plusieurs auteurs ont montré que cette restriction était une mesure efficace pour réduire le taux d'incidence des souches

productrices de BLSE. Aux Etats Unis, Rahal et al. ont démontré qu'une restriction de l'utilisation des C3G en pédiatrie entraînait une réduction de 44% du taux d'infections causées par les *Klebsiella spp.* résistantes à la ceftazidime [117]. De façon similaire, Lee et al. ont démontré une réduction du taux de prévalence des souches BLSE de 17% chez des enfants hospitalisés (de 39,8% à 22,8%; $p=0,018$) [118]. Cependant, la restriction de l'utilisation des C3G peut être perçue comme une « fausse bonne solution ». En effet, cette restriction entraînerait une augmentation de l'utilisation de carbapénèmes, molécules de dernier rempart efficaces pour traiter les infections à EBLSE qui par conséquent pourrait favoriser l'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes (aussi appelées bactéries hautement résistantes aux antibiotiques) déjà reportés dans plusieurs pays [71,119]. De plus, dans la plupart des pays à ressources limitées, les carbapénèmes sont souvent hors de la portée de la population à cause de son coût élevé (le coût d'une semaine de traitement estimé à 400€ équivaut à 4,6 fois le salaire moyen minimum au Sénégal) ou de sa faible disponibilité dans les pharmacies. De plus, dans les PED, la restriction de l'utilisation des antibiotiques en milieu hospitalier ne serait pas une mesure suffisamment efficace pour réduire la fréquence des infections à EBLSE puisque les antibiotiques sont en vente libre à bas prix dans les marchés parallèles exposant ainsi les populations à des antibiotiques contrefaits.

Dans les pays où les alternatives thérapeutiques sont peu accessibles et en absence de laboratoire de microbiologie fonctionnel, réduire la durée de prescription empirique des C3G serait une meilleure solution que leur restriction de manière drastique. Des auteurs ont montré parmi des patients admis dans un hôpital pédiatrique au Panama, qu'un arrêt de l'antibiothérapie au bout de 3 jours après s'être assuré de l'amélioration de l'état de santé de l'enfant et que les marqueurs biologiques de l'inflammation étaient revenus à une valeur normale permettait de réduire le taux de BLSE [120]. Une réflexion poussée devra être menée sur les prescriptions d'antibiotiques dans le contexte des PED afin de trouver des solutions pour maîtriser les prescriptions d'antibiotiques et promouvoir leur bon usage.

Certaines limites concernant nos études peuvent être notées. Les taux d'incidence des infections à EBLSE devraient être interprétés avec prudence. En effet, l'utilisation massive d'antibiotiques avant l'admission hospitalière au Sénégal, également reportée en Tanzanie [121], pourrait conduire à une sous estimation du taux d'infections causées par les

entérobactéries sensibles aux antibiotiques. L'observation des pratiques montre qu'en présence de fièvre chez les enfants, les personnels de santé des structures de santé du niveau primaire (postes et centres de santé) prescrivent de manière quasi systématique des antibiotiques sans réaliser au préalable un prélèvement à visée diagnostique. Le malade est donc référé à l'hôpital ou s'y rend directement lorsque son état ne s'améliore pas. Cette pratique pourrait donc expliquer le faible taux d'hémocultures positives observé dans l'étude 2 (10%).

Dans nos études, la caractérisation des souches isolées sur le plan moléculaire n'a pu être réalisée puisque nous ne disposons pas de financements suffisants pour effectuer les analyses génotypiques par un laboratoire de référence. De plus, les laboratoires des hôpitaux participants aux études ne disposaient pas d'un système de conservation des souches permettant de réaliser des analyses poussées ultérieures.

Les résultats présentés dans les différents travaux portent exclusivement sur les infections acquises à l'hôpital qui constitue un milieu favorable à l'émergence et à la dissémination des souches résistantes. Cependant, les infections à EBLSE acquises en communauté sont également fréquentes en Afrique et au Sénégal [57, 60, 78, 122]. Les mesures pour réduire la dissémination des souches EBLSE devraient donc être mises en place aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire.

Par ailleurs compte tenu du recueil rétrospectif des données, nous n'avons pas pu évaluer l'impact des prescriptions ambulatoire d'antibiotiques chez les patients malnutris. La faible complétude des dossiers médicaux explique également pourquoi certains indicateurs tels que le taux d'incidence des bactériémies par journées d'exposition au cathéter n'ont pu être évalués. De plus, nous n'avons pas pu estimer de manière exhaustive toutes les ressources consommées par le patient durant son séjour (consommables) à cause de l'absence d'un système informatisé des données. Par ailleurs, les coûts médicaux indirects supportés par la famille tels que les repas, le transport quotidien du domicile (souvent en banlieue) à l'hôpital (centre ville de Dakar) pour la prise en charge du patient non pas été inclus dans le calcul du coût alors que peuvent être considérables. Enfin, il n'a pas été possible d'évaluer le coût spécifique des bactériémies chez les enfants, en raison du manque d'information.

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont révélé une situation endémique des EBLSE au Sénégal et un impact significatif de ces infections sur le plan clinique et économique dans un contexte de pays à ressources limitées. Ce travail montre l'importance de mettre en place un système de surveillance pour suivre l'évolution épidémiologique de ces BMR et mesurer leur décroissance, seul gage d'efficacité d'un programme de lutte. La surveillance de routine mise en place dans les deux hôpitaux d'études est désormais élargie à l'ensemble des hôpitaux du pays pour surveiller l'évolution des souches BLSE et détecter l'émergence de nouvelles résistances particulièrement celles aux carbapénèmes. Le laboratoire de microbiologie a donc un rôle central dans cette surveillance. Cependant, dans les hôpitaux des PED, les laboratoires sont peu fonctionnels à cause du manque de ressources financières pour l'achat d'équipements adéquats et de personnels qualifiés formés pour réaliser les examens bactériologiques. Dans ces pays, le développement d'outils d'aide diagnostique « au lit du malade » pourrait alors permettre une prise en charge rapide et adéquate des patients et ainsi réduire l'usage inapproprié des antibiotiques telles que les C3G.

Le taux d'incidence élevé des BLSE suggère de réviser les stratégies de prescriptions empiriques d'antibiotiques et de réduire l'utilisation empirique des C3G et de l'amoxicilline. Des études sont actuellement en cours à l'Institut Pasteur de Dakar pour évaluer la nécessité d'utiliser de manière systématique ces antibiotiques en per-partum, chez les nouveau-nés et chez les enfants présentant une malnutrition sévère. L'utilisation des antibiotiques devrait être régulée aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. Par ailleurs, la prescription d'antibiotiques critiques chez l'Homme (C3G, fluoroquinolones) devrait être limitée chez l'animal et certains antibiotiques devraient être réservés à l'usage humain (ex carbapénèmes et nouveaux antibiotiques développés pour la médecine humaine). Les résultats de nos investigations suggèrent également de renforcer les mesures d'hygiène tout au long des soins et particulièrement chez les nouveau-nés. Un plan de gestion des excréta dans les hôpitaux devrait également être élaboré par le PRONALIN pour limiter les risques de dissémination des souches BLSE.

Les infections à bactéries multirésistantes telles que les EBLSE devraient être considérées comme une cause majeure de décès chez les enfants âgés de 0 à 5 ans. Une étude multicentrique coordonnée par l'Institut Pasteur de Paris est actuellement réalisée

dans 3 PED dont le Sénégal. Les objectifs de cette étude sont d'estimer l'incidence des infections causées par les BMR et d'évaluer leurs conséquences médico-économiques dans le contexte des PED. La population de l'étude est constituée d'une cohorte de nouveau-nés qui seront suivis jusqu'à l'âge de 2 ans en milieu communautaire et en milieu hospitalier lors de suspicions d'infection. La force de cette étude repose sur le suivi communautaire des nouveau-nés permettant ainsi de détecter de manière précoce les cas de suspicions d'infection. Au Sénégal, l'aide diagnostique apportée par le laboratoire de microbiologie de l'Institut Pasteur de Dakar permet de guider le clinicien lors de la prescription des antibiotiques. Les mécanismes de transmission des souches BLSE au nouveau-né font également l'objet de cette étude.

Dans l'attente de la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques pour traiter ces infections bactériennes il est urgent de lutter contre la dissémination des souches BLSE et par conséquent préserver l'efficacité des carbapénèmes. La première étape de cette lutte est la prise de conscience de ce phénomène mondial. La résistance bactérienne est désormais considérée comme une « menace globale comparable dans ses conséquences au terrorisme ou au réchauffement climatique » [123]. Une alliance internationale d'experts (Ac De BMR) s'est organisée pour lutter contre la résistance bactérienne et a permis d'inscrire les antibiotiques au patrimoine mondial de l'UNESCO. Cependant, pour vaincre cette menace mondiale, des actions venant des PED, et particulièrement de l'Afrique qui paie le plus lourd tribut, sont attendues. Depuis 2008, une association scientifique nommée Infection Control African Network (ICAN) s'est regroupée autour de certains pays anglophones et le Sénégal depuis 2012 (seul pays francophone) pour rendre l'Afrique plus visible dans la lutte contre la résistance bactérienne.

REFERENCES

- [1] Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare associated multidrug resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clinical Infect Dis.* 2013; 56:1310-8.
- [2] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci*, 1980; 289: 321-331, 1980.
- [3] Jacoby LS and Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *NEJM*. 2005; 352: 380-391, 2005.
- [4] Bush K; Jacoby GA; Meiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1211-1233.
- [5] Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8: 557-284.
- [6] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microb Rev*. 2005; 18: 657-686.
- [7] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microb Rev*. 2001; 14: 933-951.
- [8] Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D and Carmeli Y. High levels of antimicrobials co-resistance among extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 2137-2139.
- [9] Canton R, Niovais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F and Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008; vol. 14: 144-153.
- [10] Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M and Mitsunashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983; 11:315-317.
- [11] Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded-resistance to broad spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 28: 302-307.
- [12] Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*. 2008; 13:1-11.
- [13] Poiriel L, Kampfer P and Nordmann P. 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* 2002; 46: 4038-4040.
- [14] Ruppe E and Andremont A. "Le microbiote intestinal est l'avenir de la multirésistance bactérienne. 2013; 15:166-177.
- [15] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 165-174.
- [16] Haut Conseil de la Santé Publique. Commission spécialisée Sécurité des patients: infections nosocomiales et autres événements indésirables liés aux soins et aux patients, Recommandations relatives aux mesures à mettre en oeuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination. 2010.
- [17] Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases, the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 1-14.
- [18] Rupp ME and Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*. 2003; 63: 353-365.

- [19] Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2014. [Online]. http://www.sfm_microbiologie.org
- [20] Bréchet C, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P et al. Wasterwater treatment plants release large amounts of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin Inf Dis*. 2014; 58: 1658-65.
- [21] Ruimy R, Brisabois A, Bernede C, Skurnik D, Barnat S, Arlet G, Momcilovic S et al. Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of gram negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environ Microb*.2010; 12: 608-615.
- [22] Reuland EA, al Naiemi, Raadsen SA, Savelkoul PH, Kluytmans JAJW and Vandenbroucke-Grauls CMJE. Prevalence of ESBL producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *Eur J Clin Micro Inf Dis*. 2014;33:1843-1846.
- [23] Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD. Detection of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol*. 2008; 46: 136-141.
- [24] Overdest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey PM et al. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerg Inf Dis*.2011; 17.
- [25] Leverstein-van Hall, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets Gm, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL gene, plasmids and strains. *Clin Micro Infect*. 2011; 17: 873-80.
- [26] Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortes P, Gonzalez JJ, Lavilla S, Miro E, Muniesa M, Saco M, Tortola MT, Mirelis B, Coll P, Ilagostera M, Prats G, Navarro F. Extended-spectrum beta-lactamases Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58: 211-215.
- [27] Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Canton R, Cobo J. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum beta-lactamases producing organisms in household contacts of infected community patients. *J Clin Microb*. 2008; 46: 2796-2799.
- [28] Rodriguez-Bano J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases producing *E.coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62: 1142-1149.
- [29] Peter ET, Gajanana D, Johnston B, Clabots C, Tamarkin FJ and Johnson JR. Transmission of an extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* (sequence type ST131) strain between a father and daughter resulting in septic shock and emphysematous pyelonephritis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47:, 3780-3782.
- [30] Tande D, Boisrame-Gastrin S, Munck MR, Henry-Arnaud G, Gouriou S, Jallot N et al. Nordmann P, Naas T. Intrafamilial transmission of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Salmonelle enterica* Babelsberg among the families of internationally adopted children. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 859-865.
- [31] Tande D, Jallot N, Bougoudogo F, Montagnon T, Gouriou S, Sizun J. Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in a Malian orphanage. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 472-4.
- [32] Tham J, Odenholt I, Walder M, Brolund A, Ahl J, Melander E. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. *Scand J Infect Dis*.2010; 42: 275-280.

- [33] Paltansing S, Vlot JA, Kraakman ME, Mesman R, Bruijning ML, Bernards AT et al. Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae among travellers from the Netherlands. *Emerg Inf Dis*. 2013;19: 1206-13.
- [34] Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andreumont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Micro Rev*. 2013; 26:744-758.
- [35] Falagas DE and Karageorgopoulos ME. Extended-spectrum beta-lactamase producing organisms. *J Hosp Infect*. 2009; 73: 345-354.
- [36] Canton R and Coque TM, "The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9: 466-475.
- [37] Turner PJ, Greenhalgh, Edwards JR and McKellar. The MYSTIC (meropenem yearly susceptibility test information collection) program. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1999; 13: 117-125.
- [38] Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis*. 2001; 15: 94-103.
- [39] Bell JM, Turndige JD, Gales AC, Pfaller AM and Jones RN. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Micr Inf Dis*. 2002; 42: 193-198.
- [40] Gossens H and Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diag Micr Inf Dis*. 2005; 53: 257-264.
- [41] Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA et al. Antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. *ICHE*.2008; 29: 996-1011.
- [42] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net). [Online].
http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx
- [43] Réseau BMR-RAISIN. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Résultats 2013. [Online]. <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2015/Surveillance-des-bacteries-multiresistantes-dans-les-etablissements-de-sante-en-France>
- [44] Arnaud I, Maugat S, Jarlier V, Astagneau P, for the National Early Warning, Investigation and Surveillance of Healthcare-Associated Infections Network (RAISIN) / multidrug resistance study group. Ongoing increasing temporal and geographical trends of the incidence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae infections in France, 2009 to 2013. *Eurosurveillance*.2015;20
- [45] Comité technique national des infections nosocomiales. 100 recommandations pour la surveillance et la surveillance des infections nosocomiales. 2009.
- [46] Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, Marty N, Dumartin C, Bertrand X et al.on behalf of the MDRB Surveillance National Steering GVroup (BMR-RAISIN). National multidrug-resistant bacteria

- (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 954-959.
- [47] Jarlier V, Trystam D, Brun-BVuisson C et al. Curbing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. *Arch Intern Med.* 2010; 170:552-559.
- [48] Lucet JC, Birgand G. Les bacilles à gram négatif multirésistants: où va t-on?. *Journal des anti infectieux.* 2011;13: 122-132.
- [49] Lo WU, Ho PL, Chow KH, Lai EL, Yeung F, Chiu SS. Fecal carriage of CTX-M type extended spectrum beta-lactamase producing organisms by children and their households contacts. *J Infect.* 2010; 60: 286-292.
- [50] UNICEF. Progrès en matière d'assainissement et d'alimentation en eau. Rapport 2013.
- [51] Laupland KB, Church DL, Vidakovich J, Lucenski M, Pitout JDD. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *Journal of Infection.* 2008; 57: 441-448.
- [52] Tangden T, Cars O, Melhu A, Lowdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 3564-3568.
- [53] Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estella C, El-Mniai A, Boussadia Y, Consigny PH et al. "Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. *Euro Surveill.* 2014.
- [54] Tansarli GS, Poulidakos P, Kapaskelis A and Falagas M. Proportion of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing isolates among Enterobacteriaceae in Africa: evaluation of the evidence-systematic review. *JAC.* 2014; 69: 1177-1184.
- [55] Viktor Storberg. ESBL producing Enterobacteriaceae in Africa - a non systematic literature review of research published 2008-2012. *Infection Ecology and Epidemiology.* 2014; 4: 2032.
- [56] Muvunyi CM, Masaisa F, Bayingana C et al. Decreased susceptibility to commonly used antimicrobial agents in bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Rwanda: need for new antimicrobial guidelines. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84: 923-8.
- [57] Lonchel CM, Meex C, Gangoue-Pieboji J, Boreux R, Assoumou MC, Melin P, De Mol P, Proportion of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in community setting in Ngaoundere, Cameroon. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 53.
- [58] Kiiru J, Kariuki S, Godderris BM and Butaye P. Analysis of beta-lactamase phenotypes and carriage of selected beta-lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. *BMC Microb.* 2012; 12: 155.
- [59] Isendhal J, Turlej-Rogacka A, Manjuba C, Rodrigues A, Giske CG, Naucier P. Fecal carriage of ESBL producing *E.coli* and *K.pneumoniae* in children in Guinea-Bissau: a hospital-based cross sectionnal study. *Plos One* 2012; 7: e51981.
- [60] Schaumburg F, Alabi A, Kokou C, Grobusch MP, Kock Ret al. High burden of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Gabon. *JAC.* 2013; 68: 2140-3.
- [61] Andriatahina T, Randrianirina F, Hariniana ER, Talarmin A, Raobijaona H, Buisson Y, Richard V. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. *BMC Infect Dis.* 2010; 10:204.
- [62] World bank data. [Online]. www.data.worldbank.org/indicator
- [63] Agence Nationale de la Statistique et Démographie. Rapport définitif du recensement générale

- de la population et de l'habitat, de l'agriculture et de l'élevage 2013. [Online]. <http://www.ansd.sn/>
- [64] PNUD. Objectifs du Millénaire. [Online]. <http://sn.undp.org>
- [65] Agence Nationale de la Statistique et Démographie. Enquête démographique et santé 2014. [Online]. <http://www.ansd.sn>
- [66] Organisation Mondiale de la Santé. Modèle pour l'auto-évaluation de la promotion et des pratiques d'hygiène des mains au niveau de l'établissement de soins. [Online]. www.who.int/gpsc/country_work/hhsa_framework_fr.pdf
- [67] Saied T, Elkholy A, Hafez SF, Basim H, Wasfy MO, El-Shoubary W et al. Antimicrobial resistance in pathogens causing nosocomial bloodstream infections in university hospitals in Egypt. *Am j Infect Control*. 2011; 39: e61-5.
- [68] Woerther PL, Angebault C, Jacquier H, Hugede HC, Janssens AC, Sayadi S et al. Massive increase, spread and exchange of extended spectrum beta-lactamase encoding genes among intestinal Enterobacteriaceae in hospitalized children with severe acute malnutrition in Niger. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: 677-85.
- [69] Ogbolu DO, Daini OA, Ogunledun A et al. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37: 62-6.
- [70] Nordmann P, Cuzon G and Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009; 4: 228-36.
- [71] Nordmann P, Naas T and Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infect Dis*. 2011; 17: 1791-1798.
- [72] Manenzhe RI, Zar HJ, Nicol MP, Kaba M. The spread of carbapenemase-producing bacteria in Africa: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70: 23-40.
- [73] Organisation Mondiale de la Santé. Manuel sur la PCIME: la prise en charge des maladies de l'enfant. [Online]. http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9241546441/fr/
- [74] Jackson C. Multi-state modelling with R: the msm package. 2014.
- [75] Aalen O, Johansen S. An empirical transition matrix for non-homogeneous Markov chains based on censored observations. *Scand J Stat*. 1978; 5:141-150.
- [76] Zaidi AKM, Charles-Huskings C, Thaver D, Bhutta ZA, Abbas Z and Goldmann DA. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*. 2005; 365:1175-88.
- [77] Blomberg B, Jureen R, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile D, Urassa WK et al. High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43: 745-49.
- [78] Zaidi AKM, Thaver D, Ali SA, Kan TA. Pathogens associated with sepsis in newborns and Young children in developing countries. *Ped Inf Dis*. 2009; 28: 10-18.
- [79] Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE and the WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005; 365: 1147-1152.
- [80] UN Inter-agency group for child mortality estimation. Levels and trends in child mortality-Report 2011.
- [81] La Banque Mondiale. [Online]. <http://donnees.banquemondiale.org/indicateur>
- [82] Bhojani U, Thriveni BS, Devadasan R, Munegowda CM, Devadasan N, Kolsteren and Criel B. Out-of-pocket healthcare payments on chronic conditions impoverish urban poor in Bangalore, India.

BMC Public Health.2012; 12: 990.

- [83] Kruk ME, Goldmann E and Galea S. Borrowing and selling to pay for healthcare in a low and middle-income country. *Health affairs*. 2009;28:1056-1066.
- [84] Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT and Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with healthcare associated infections caused by antibiotic resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 109.
- [85] Lee SY, Kopapati S, Kuti JL, Nightingale CH and Nicolau DP. Impact of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: a matched cohort study. *ICHE*. 2006; 27: 1226-1232,.
- [86] Tumbarello M, Spanu T, Bidino R, Marchetti M, Ruggeri M, Trecarichi EM et al. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* influence of extended-spectrum beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2010; 54: 4085.
- [87] Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 1257-1262.
- [88] Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Eldestein H and Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* : risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 1162-1171.
- [89] Gandra S, Barter DM and Laxminarayan R. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clin Micro Inf*. 2014; 20: 973-979.
- [90] De Angelis G, Allignol A, Murthy A, Wolkewitz M, Beyersmann J, Safran E et al. Multistate modelling to estimate the excess length of stay associated with meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation and infection in surgical patients. *Journal of Hospital Infection*. 2011; 78: 86-91.
- [91] Stewardson A, Fankhauser C, De Angelis G, Rihner P, Safran E, Schrenzel J et al. Burden of bloodstream infection caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae determined using multistate modeling at a Swiss University Hospital and a nationwide predictive model. 2013; 34: 133-43.
- [92] De Angelis G, Murthy A, Beyersmann J and Harbarth S. Estimating the impact of healthcare associated infections on length of stay and costs. *CMI*.2010; 16: 1729-1735.
- [93] Barnett AG, Beyersmann J, Allignol A, Rosenthal VD, Graves N, Wolkewitz M; The time-dependent bias and its effect on extra length of stay due to nosocomial infection. *Value Health*; 14:381-386.
- [94] Beyersmann J, Wolkewitz M, Allignol A, Grambauer N, Schumacher M. Application of multistate models in hospital epidemiology: advances and challenges. *Biom J*. 2011; 53, 332-350.
- [95] Beyersmann J, Wolkewitz M, Schumacher M. The impact of time-dependent bias in proportional hazards modelling. *Stat Med*. 2008; 27: 6439-54.
- [96] Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y and Samore MH. Methodological principles of case -control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. *Clinical Infec Dis*. 2001; 32: 1055-61.
- [97] Harris AD, Samore MH, Lipsitch M et al. Control-group selection importance in studies of antimicrobial resistance: examples applied to *Pseudomonas aeruginosa*, enterocci and *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 1558-63.

- [98] Kaye KS, Harris AD, Samore M, Carmeli Y. The case-case-control study design: addressing the limitations of risk factor studies for antimicrobial resistance: a systematic review" *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005; 26: 346-51.
- [99] Park SY, Kang CI, Joo EJ et al. Risk factors for multidrug resistance in nosocomial bacteremia caused by extended- spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist*. 201; 18: 518-24.
- [100] Kaya O, Akcam FZ, Gonen I, Unal O and Ceylan T. Risk factors for bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in a Turkish hospital. *J Inf Dev Countries*. 2013; 7: 507-512.
- [101] Zavascki AP. Assessing risk factors for acquiring antimicrobial resistant pathogens: a time for a comparative approach. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 871-872.
- [102] Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y and Xie X. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intens Care Med*. 2002; 28: 1718-1723.
- [103] Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH and Kim EC. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:1481-1491.
- [104] Tsai MH, Chu SM, Hsu JF, Lien R, Huang HR, Chiang MC et al. Risk factors and outcomes for multidrug-resistant gram negative bacteremia in the NICU. *Pediatrics*. 2014; 113: 322-329, 2014.
- [105] Aiken AM, Neema Mturi, Patricia Njuguna, Shebe Mohammed, James A Berkley, Isaiah Mwangi et al. "Risk and causes of paediatric hospital-acquired bacteraemia in Kilifi District Hospital, Kenya: a prospective cohort study. *Lancet*,. 2011; 2021-27.
- [106] Perez F, Pultz MJ, Endimiani A, Bonomo RA, Donskey CJ. Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 6: 2585-9.
- [107] Bhalla A, Pultz NJ, Ray AJ, Høyen CK, Eckstein EC, Donskey CJ. Antianaerobic antibiotic therapy promotes overgrowth of antibiotic-resistant, gram negative bacilli and vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 9: 644-9.
- [108] Pena C, Pujol M, Ricart A, Ardanuy C, Ayats J, Linares J et al. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit, *J Hosp Infect*. 1997; 35:9-16.
- [109] Trehan I, Goldbach HS, LaGrone LN, Meuli GJ, Wang RJ, Maleta KM et al. Antibiotics as part of the management of severe acute malnutrition. *N Engl J Med*. 2013; 368: 425-35.
- [110] African Patient Safety Program.Organisation Mondiale de la Santé. [Online]. <http://www.who.int/patientsafety/implementation/apps/events/ABHR-workshopreport.pdf>
- [111] Tumbarello M, Sali M, Trecarichi , Leone F, Rossie M, Fiori G et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 3244-3252.
- [112] Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi, Posteraro B, Fiori B et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51:1984-1994.

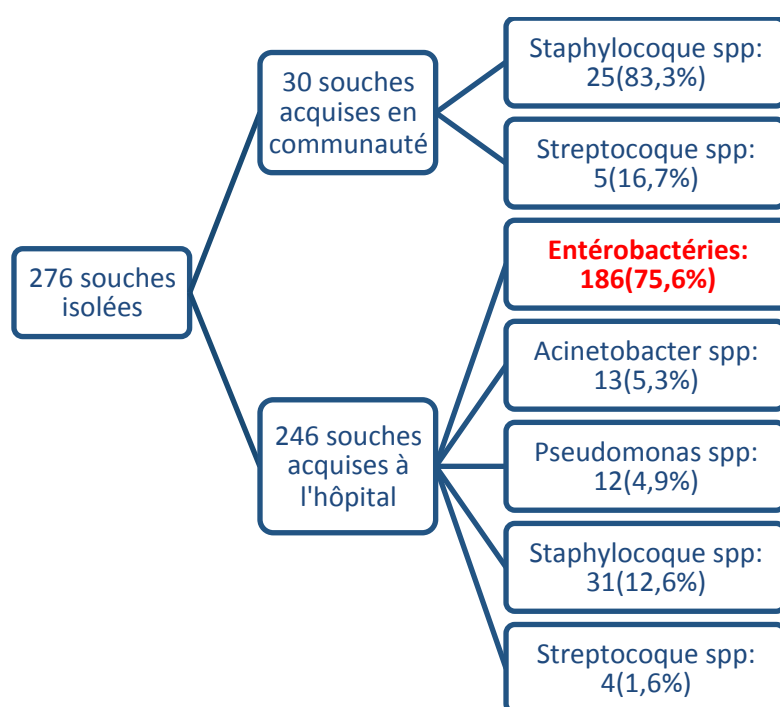
- [113] Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB and Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern Med*. 2005; 165: 1375-1380.
- [114] Kollef MH, Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2000; 3: 131-138.
- [115] Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2001; 33: 1288-94.
- [116] Paterson DL and Rice LB. Empirical antibiotic choice for the seriously ill patient: are minimization of selection of resistant organisms and maximisation of individual outcome mutually exclusive? *Clinical Infect Dis*. 2003; 36,: 1006-12.
- [117] Rahal JJ, Urban C, Horn D, Freeman K, Segal-Maurer S, Maurer J et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA*. 1998; 280,: 1233-7.
- [118] Lee J, Pai H, Kim YK, Kim NH, Eun BW, Kang HJ et al. Control of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a children's hospital by changing antimicrobial agent usage policy. *Journal Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 629-637.
- [119] Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM, Jarlier V, Coignard B. Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2004 to 2011. 2011; *Euro Surveill*; 16.
- [120] Saez-Llorens X, Castrejon de Wong MM, Casteno E, De Suman O, De Moros D, De Atencio I. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19, 200-6.
- [121] Blomberg B, Manji KP, Urassa WK, Tamim BS, Mwakagile DM, Jureen R et al. Antimicrobial resistance predicts death in Tanzanian children with bloodstream infections: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*. 2007; 7: 43.
- [122] Woerther PL, Diop A, Sene AM, Da Costa A, Arlet G, Andremont A, Rouveix B, Ruppe E. Carriage of CTXM-15 producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother* . 2009; 53: 3135-3137.
- [123] Andremont A, *Antibiotiques, le naufrage. Notre santé en danger*. Broché.

ANNEXE 1

Souches bactériennes isolées dans l'étude pilote

Durant les 6 mois de la surveillance pilote menée dans les 2 hôpitaux, 276 souches bactériennes ont été isolées des prélèvements à visée diagnostique réalisés chez les patients hospitalisés. Les entérobactéries représentaient 76% (N=186) des souches associées aux infections acquises à l'hôpital (N=246 souches) (Figure 18).

Figure 18 : Souches bactériennes isolées des prélèvements à visée diagnostique
- Etude pilote (N=276)



ANNEXE 2

**Infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing
Enterobacteriaceae : clinical and economic impact in patients
hospitalized in two teaching hospitals in Senegal**

(Article soumis à la revue ARIC)

Acceptée pour publication

Infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: clinical and economic impact in patients hospitalized in 2 teaching hospitals in Dakar, Senegal.

Awa Ndir^{1,2*}, Amadou Diop³, Roughyatou Ka⁴, Pape Makhtar Faye³,
Ndeye Mery Dia-Badiane⁴, Babacar Ndoeye⁵ and Pascal Astagneau⁶

*Corresponding author: Awa Ndir andir@pasteur.sn

¹ PhD Program, Université Pierre Marie Curie, Paris, France

² Institut Pasteur de Dakar, Epidemiology unit, Dakar, Sénégal

³ Hôpital pour Enfants Albert Royer, Dakar, Sénégal

⁴ Centre Hospitalier Universitaire de Fann, Dakar, Sénégal

⁵ Infection Control Africa Network Board

⁶ Universités Sorbonne Paris-Cité, Paris, France

Authors' emails

Awa Ndir: andir@pasteur.sn

Amadou Diop: amadoudioplaba@yahoo.fr

Roughyatou Ka: roughyka@hotmail.com

Pape Makhtar Faye: fayemakhou@hotmail.com

Ndeye Mery Dia-Badiane: ndeyemery@gmail.com

Babacar Ndoeye: basendoye2@yahoo.fr

Pascal Astagneau: pascal.astagneau@sap.aphp.fr

Abstract

Background: Infections caused by extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are of major concern in clinical practice because of limited therapeutic options effective to treat them. Studies from Africa showed that ESBLs, widely spread in Europe, United States or Asia; are also frequent in the African continent. However, the impact of the ESBLs infections is yet to be adequately determined in Sub-saharan African countries. **Objective:** To estimate the incidence rate of ESBL producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) infections and to assess their clinical and economic impact. **Methods:** A retrospective cohort study was conducted in patients hospitalized during a 6-month study period and included 3 groups of patients: those with an infection caused by an *Enterobacteriaceae* producer of ESBL (ESBL-positive) or an *Enterobacteriaceae* non-producer of ESBL (ESBL-negative) and patients who did not experience an infection. Multivariable regression analysis was performed to identify risk factors for fatal outcome. A multistate model and a cost-of-illness analysis were used to respectively estimate the excess length of stay (LOS) attributable to ESBL production and costs associated. A cox proportional hazards model was used to assess the independent effect of ESBL-positive and ESBL-negative infection on LOS. **Results:** The incidence rate of ESBL-E infections was 3 cases/1,000 patient-days (95% CI: 2.4-3.5 cases/1,000 patient-days). Case fatality rate was higher in ESBL-positive infection than in ESBL-negative infection (47.3% versus 22.4%, $p=0.0006$). ESBL production was an independent risk factor for fatal outcome (OR=5.7, 95%CI: 3.2-29.6, $p=0.015$). ESBL production increased LOS (+4.1 days) and significantly reduced the hazard of discharge after controlling for confounders (HR=0.32, 95%CI: 0.24-0.42). The additional cost of €100 associated with ESBL-production is substantial given the lower-middle-income status of

Senegal. **Conclusion:** Our findings show an important clinical and economic impact of ESBL-E infections in Senegal and emphasize the need to implement adequate infection control measures to reduce ESBL-E incidence rate. An antibiotic stewardship program is also crucial to preserve the effectiveness of our last-resort antibiotic drugs.

Keywords: ESBL, *Enterobacteriaceae*, antibiotic resistance, impact, economic, Africa, cost-of-illness, multistate model

Introduction

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are of major concern since infections caused by these resistant strains are associated with prolonged hospital stay and increased case-fatality rate [1-3]. ESBLs became a significant therapeutic challenge worldwide in daily clinical practice because their resistance to additional classes of antibiotics reduces effective therapeutic options [4-6]. However, the increased use of carbapenems, considered as drugs of last-resort to treat infections caused by ESBL producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E), favors the emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* [7-9]. It is thus crucial to know the extent of the threat poses by ESBLs and to quantify its burden in order to help policymakers and healthcare professionals to set priorities and implement effective countermeasures. In Africa published studies showed that ESBL prevalence rate is increasing and is estimated to vary from 0.7% in Malawi to 75.8% in Egypt [10,11]. However, until now the burden of ESBLs has not been clearly established.

This study aimed to estimate the incidence rate of ESBL-E infections and to assess the clinical and economic impact of these infections in two hospitals in Dakar, Senegal.

Materials and methods

Study design and population

A retrospective cohort study was carried out from April to October 2012 at the University Hospital of Fann and Albert Royer Children's hospital, 2 academic tertiary care hospitals located in the same geographic area in Dakar (respectively a 339-Bed and 120-bed hospitals).

Three groups of patients were included in this study: patients infected by an *Enterobacteriaceae* producer of ESBL (ESBL-Positive infection), patients infected by an *Enterobacteriaceae* non producer of ESBL (ESBL-negative infection) and patients not infected during their hospital stays (ESBL-free infection). Infected patients were identified from a laboratory-based survey performed in the 2 hospitals and included all hospitalized patients with a diagnostic sample drawn from April to October 2012 in case of infection suspicion. The date of the infection onset was the date the first sample yielding an *Enterobacteriaceae* strain was collected. If an *Enterobacteriaceae* strain was isolated on several occasions, only the first isolation was considered. Patients who did not experience an infection were randomly selected from the hospital database system. The inclusion criteria were the absence of a diagnostic sample drawn during the hospital stay, the absence of clinical signs of infection and antibiotic prescriptions recorded in medical files. For each infected patient, one patient free of infection admitted the same day and in the same unit was selected for inclusion in the study. All patients included in the study were followed from admission to discharge or in-hospital death. For each study patient, the following variables were collected: gender, age, germs isolated and their resistance profile, underlying comorbidities, diagnosis at admission, interventions related to patient care, length of

stay, date of infection onset, antibiotic prescriptions during the hospital stay and in-hospital mortality.

Definitions

Newborns were patients less 28 days of life and included preterms (premature babies) defined as babies born before 37 weeks of gestational age. Children were patients aged between 1 month and 16 years and adults were up to 16 years.

An infection was suspected by the clinician in the presence of clinical signs of infection observed and was bacteriologically confirmed when a bacterial strain was recovered from diagnostic samples. In newborns and children, an infection was suspected in the presence of fever ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), hypothermia ($< 36^{\circ}\text{C}$) or other signs of infection as detailed in the World Health Organization guideline of the Integrated Management of Childhood Illness [12]. Infections were defined as ESBL-positive when the sample yielded an ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) and ESBL-negative when *Enterobacteriaceae* was non-producer of ESBL. Antimicrobial therapy was defined as empirical if prescribed initially before susceptibility tests results were available. Initial antibiotic therapy was considered as inadequate when the empirical antibiotic drug was not active against the pathogen causing the infection.

Microbiological methods

Enterobacteriaceae strains were Gram stained and then identified with API 20E strips (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Susceptibilities against antimicrobial agents and the detection of ESBL production were routinely performed in the 2 hospitals by the disk diffusion synergy method using discs containing ceftazidime,

ceftriaxone and cefotaxime each placed 30mm apart around a disc containing amoxicillin plus clavulanic acid discs as recommended by the Antibigram Committee of the French Microbiology Society [13].

Statistical analysis

Continuous variables were compared using Student's t test with unequal variances. Fisher's exact test was used for the comparison of categorical variables.

To evaluate the independent effect of ESBL production on fatal outcomes, a multivariable model was performed using a backward stepwise logistic regression analysis including all variables with a p-value less than 0.20 in the univariate analysis. P value less than 0.05 was considered as significant. All statistical analysis were performed using Stata software, release 13.0.

Multistate model

The excess length of stay (LOS) attributable to ESBL production was estimated using a multistate model in which the occurrence of the infection was the time-dependent exposure, while discharge (alive or dead) was the study endpoint (Figure 1). Patients enter the multistate model in state 1 at hospital admission. At the time of infection (ESBL-positive or ESBL-negative) patients move to state 2 then to state 3 at the time of discharge or death. Patients who do not experience an infection during their hospital stay move directly from state 1 to state 3. The excess LOS attributable to ESBL production was the difference between LOS due to ESBL-positive and LOS due to ESBL-negative infection. When assessing the LOS due to ESBL-positive infection, patients with ESBL-positive infection were compared to patients free of infection and patients with ESBL-negative infection before the infection onset. The

latter were administratively censored at the time of infection. Likewise, patients with an ESBL-positive infection were administratively censored at the time of infection when assessing the LOS due to ESBL-negative infection [14-15].

Transition probabilities to move from one state to another state were estimated non-parametrically using the Aalen-Johansen estimator [15-17]. The expected LOS was then computed by a function of the Aalen-Johansen estimator for the matrix of transition probabilities. The mean difference in LOS was computed for each day in the interval, as the difference between the estimated LOS given the intermediate state had been reached or not up that day. Standard errors and confidence intervals were derived by 500 bootstrap resampling runs [15,18-19].

To assess the independent effect of ESBL-positive and ESBL-negative infection on LOS, they were separately evaluated as time-dependent covariates using Cox proportional hazards modeling to estimate the end-of-LOS hazard ratio (HR). Variables for adjustment included age, sex and comorbidities and invasive devices.

The R packages *msm* and *etm* were used for LOS analysis (version 2.15.3).

Cost-of-illness analysis

A cost-of-illness (COI) analysis was performed to quantify the cost associated with ESBL production from the patient perspective. Only direct medical costs incurred by patients from the date of the infection onset were measured. Indirect costs such as lost wages resulting from death or absence from work were not considered in our analysis. A bottom-up approach was used to calculate the resources spent on the treatment of the infection. Therefore total cost of infection (ESBL-positive or ESBL-negative infection) included costs of hospital stay, laboratory diagnosis tests and antibiotic drugs prescriptions. The cost of hospital stay was calculated by multiplying the excess LOS attributable to the infection (estimated by multistate modeling) by the

bed-day cost. For costs of diagnostic tests we considered the inclusive fee of €23 charged for all laboratory tests performed on a patient during the hospital stay, regardless of their number and nature. The dosage and duration of antibiotic drugs prescriptions to treat the infection were collected from patient's medical file. The drug price used differs according to whether drugs were bought at the subsidized hospital pharmacy or purchased in private pharmacies.

Ethical considerations

This study protocol was approved by the hospital's institutional review board. Since the data were routinely collected and anonymized, ethical consent was not required.

Results

Characteristics of the study patients

During the 6-month study period, 186 *Enterobacteriaceae* strains were isolated from samples drawn in patients with a suspected infection. *Enterobacteriaceae* producers of extended-spectrum beta-lactamases (n=110) were *Klebsiella spp* (49.1%), *Enterobacter spp* (28.2%) and *E.coli* (22.7%). The incidence rate of ESBL-E was of 3 cases /1000 patient-days (95% CI: 2.4- 3.5 cases /1,000 patient-days).

Thirty seven hundred and two patients were included in the cohort study. Among them, 110 patients had an ESBL-positive infection, 76 patients had an ESBL-negative infection and 186 patients did not experience an infection during their hospital stay.

The mean age of patients free of infection was 27 years (0-90 years) and 55.6% were male.

Characteristics of patients infected by an *Enterobacteriaceae* were presented in table 1. The mean age of infected patients was 27.0 years (0-90 years) and 46.2% were male. ESBL-E infections were mainly bloodstream infections (44.5%), urinary tract infections (32.7%) and surgical site infections (11.8%). The mean time to infection was significantly greater in ESBL-positive than in ESBL-negative infection (8.2 versus 4.8 days, $p=0.007$) (Table 1). Inappropriate initial antibiotic therapy was more frequent in ESBL-positive than in ESBL-negative infection (88.2% versus 18.4%, $p<0.001$). The hospital stay after infection was significantly longer in ESBL-positive infection than in ESBL-negative infection (14.2 versus 9.3 days, $p<0.0001$).

Fatal outcomes

Sixty-nine patients with an infection caused by an *Enterobacteriaceae* died during the study period (37.1%). ESBL-positive infection was associated with a higher case-fatality rate than ESBL-negative infection (47.3% versus 22.4%, $p=0.0006$). ESBL production was found to be an independent risk factor for fatal outcome (OR=5.3, 95%CI: 3.1-19.9, $p=0.008$). Multivariable analysis also showed that mechanical ventilation was an independent risk factor for fatal outcome (OR=6.1, 95%CI: 3.1-124.6, $p=0.040$) and that newborns and patients suffering from meningitis or cancer were at-risk patients for mortality (Table 2).

Length of stay (LOS)

Then mean LOS associated with ESBL-positive and ESBL-negative was respectively 22.6 days (95% CI: 20.3-24.9 days) and 14 days (95%CI: 11.9-16.2 days). Results presented in table 3 indicated that ESBL production was associated with an excess LOS of 4.1 days (95%CI: 3.8-4.6) and significantly decreased the hazard of

discharge after adjustment for confounding (HR:0.32, 95%CI:0.24-0.42). However, ESBL-negative infection did not significantly decrease the hazard of being discharged (HR:0.92, 95%CI:0.71-1.20).

Cost-of-illness analysis

The cost-of-illness (COI) analysis indicated a mean hospital cost significantly greater in ESBL-positive infection (€215, 95%CI: €196-233) than in ESBL-negative infection (€115, 95%CI: €103-123), $p < 0.0001$ (Table 4). The additional cost attributable to ESBL production was €100 (95%CI: €78-€125). Hospital stay and antibiotic drugs accounted respectively for 60% and 40% of this additional cost.

Discussion

Our study quantifies the economic impact of ESBL-E infections in patients admitted in 2 hospitals in Senegal. The additional cost of €100 attributable to the ESBL production may appear as low compared to costs reported in the literature from high-income countries, which vary from €4,497 to €14,720 [2,14,20-21]. The difference in costs could be explained firstly by the cost and sophistication of the equipment used for diagnostic tests and patient care in developed settings, and secondly by the variability in methods used to estimate the economic impact of ESBL infections. Indeed, studies that use uninfected control groups, consider the occurrence of the infection as time-fixed or measure median values are shown to overestimate costs [22]. We avoided those pitfalls by using infected patients as control group (cases 2), considering the infection as time-dependent and measuring mean values in our cost-of-illness (COI) analysis. Costs were estimated from the patient's perspective and not from the hospital or third-party payer perspective as frequently found in the literature.

Indeed in Senegal, hospital costs are most of the time entirely outlaid by the majority of patients since only 20% of the population has a healthcare coverage. Costs associated with ESBL-positive or ESBL-negative infection might be considerable for some patients, since these costs are respectively 2.5-times and 1.3-times higher than the mean monthly salary (€87) in the country [23]. These out-of-pocket expenses can be crippling for already-impooverished households, pushing them further into poverty [24,25]. Kruk *et al.* demonstrated that 37.8% (95%CI: 30.7-45.5) of Senegalese households often resort to “hardship financing” defined as borrowing money from family, friends or selling their assets to cover hospital costs [26].

Besides, the hospital charges attributable to ESBL production would be more burdensome if antimicrobial therapy such as imipenem, considered as last-resort drug effective to treat ESBL-E infections, was prescribed. A 7-day treatment by imipenem would lead to an additional cost of €400. The unavailability of imipenem in pharmacies or its unaffordability to the majority of patients in Senegal may increase the risk of therapeutic failure in severe ESBL-positive infection and thereby the risk of fatal outcome. Indeed, our results demonstrated that ESBL production was an independent risk factor for fatal outcome (OR=5.3, 95%CI: 3.1-19.9, $p=0.008$).

The choice of appropriate antibiotic drugs is crucial to treat ESBL-E infections however, hospital stay was found to be the major driver of costs and could represent up to 60% of costs as previously shown [21]. Patients with ESBL-positive infection had a greater hospital stay after infection than patients with ESBL-negative infections (14.4 versus 9.3 days, $p<0,0001$) indicated that ESBL production prolonged the hospital LOS.

The time-dependent nature of infections should be taken into account when assessing the excess LOS attributable to a multidrug resistant pathogen. Indeed, it

has been shown that the time-dependent bias will inevitably overestimate the impact of the infection on LOS and consequently on hospital costs [27,30]. Therefore, we used a multistate model that accounts for time-varying exposure thereby avoiding the time-dependent bias inherent in other commonly used statistical methods [15,28-30]. Results of the multistate model revealed an excess LOS attributable to ESBL production of 4.1 days (95%CI: 3.8-4.6). Cox proportional hazard models showed a significant reduction in hazard of discharge associated with ESBL-positive infection after adjustment on confounders and consequently a prolonged hospital stay. The high rate of inadequate initial antimicrobial therapy (IIAT) associated with ESBL-positive infection might delay the initiation of adequate therapy and consequently explained the prolonged LOS associated with ESBL production. Given that we suggest to adapt the current antibiotic prescriptions' guidelines to the local bacterial epidemiology and to restrict the frequent empirical use of 3rd generation cephalosporins.

The multistate model is a suitable approach when assessing the excess LOS attributable to ESBL production however, while taking into account time-dependent bias, the excess LOS may still be biased by other covariates. Besides, our findings should be interpreted with cautious since we could not collect data on prior antibiotic exposure that may potentially underestimate the incidence rate of ESBL-positive infections. Additionally results presented in this article are about the clinical and economic impact of ESBL-E infections estimated among patients admitted in 2 hospitals in Dakar therefore cannot be generalized to the whole Senegal.

Despite these limitations, our findings should increase the awareness of hospitals' management staff and healthcare decision makers on the ESBL-E infections threat

and should incite them to implement adequate infection prevention and control policies to reduce the incidence rate of ESBL-E infections and their impact. During the study period, an evaluation of hand hygiene practices and promotion in the 2 hospitals settings using a WHO hand hygiene assessment tool [33] showed that some measures were in place but not to a satisfactory standard. An infection control program including the promotion of alcohol-based handrub (ABHR) use should be implemented in these hospitals in order to improve their basic hand hygiene levels. Indeed, hand washing using alcohol-based handrub (ABHR) was showed to be successful to reduce the incidence rate of antimicrobial resistant pathogens [34-36]. To ensure the availability of expensive ABHR in resource-poor countries, the WHO African Partnerships for Patient Safety program have launched a program in the 2 study settings for the local production of ABHR [37]. Additionally, infection control measures specifically targeting ESBLs producing strains such as the management of excreta should also be implemented since the main reservoir of *Enterobacteriaceae* strains is the human digestive tract.

Conclusion

We show that ESBLs are frequent in Senegal and that infections caused by these multiresistant pathogens increased the case-fatality rate among hospitalized patients and prolonged the hospital length of stay associated with an important financial impact for patients. Our findings are a call for action to healthcare policymakers to consider multidrug resistance as a national health priority and to implement adequate infection control measures to tackle this worldwide issue. Surveillance surveys should be implemented in sub-Saharan African countries in order to have a more

accurate estimate of the global extent of ESBLs, which threaten the effectiveness of last-resort drugs.

Competing interests

None to declare.

Authors' contributions

AN conceived, designed the study, coordinated the data collection, performed statistical analysis and wrote the manuscript. AD led the laboratory work and helped for the preparation of the manuscript. RK led the laboratory work and help for the preparation of the manuscript. PMF was involved in the data collection and the review of medical records. NDB was involved in the data collection and the review of medical records. BN contributed to the conception of the study and made substantial contributions in drafting the manuscript. PA contributed to the conception and design of the study, supervised the study, interpreted data analysis, and made substantial contributions in drafting the manuscript and revising it critically. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments:

We thank Yaye Dior Dieng and Koumou Onanga for the data collection, the Directors of the two study settings, the heads of the microbiology laboratories and the hospital administrative teams for their helpful support. We are grateful to Momar Dieng and Vincent Richard for their critical review of the manuscript. We also thank Cheikh Loucoubar for his contribution in statistical analyses performed.

References

1. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, and Fishman NO. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:1162-1171
2. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, and Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:1257–1262
3. Paterson DL, Bonomo R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18:657–686.
4. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Inf Dis*. 2001, 32: 1162-1171.
5. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Fishman NO, Bilker WB et al. Risk factors for Increasing multidrug resistance among Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 1317-1324.
6. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz and Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:2137-2139.
7. Nordmann P, Naas T and Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011; 10:1791-1798.

8. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 2011; 6:653-6.
9. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Inf Dis.* 2009; 9:228-36.
10. Storberg Viktor. ESBL-producing Enterobacteriaceae in Africa- a non-systematic literature review of research published 2008-2012. *Infection Ecology and Epidemiology.* 2014;4:20342.
11. Tansarli GS, Poulidakis P, Kapaskelis A and Falagas ME. Proportion of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing isolates among Enterobacteriaceae in Africa: evaluation of the evidence-systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:1177-1184.
12. Organisation Mondiale de la Santé. Manuel sur le PCIME: la prise en charge des maladies de l'enfant.
13. Soussy CJ, Carret G, Cavallo JD et al. Antibigram Committee of the French Microbiology Society. Report 2000–2001. *Pathol Biol.* 2000; 48: 832–71.
14. Stewardson A, Fankhauser C, De Angelis G, Rohner P, Safran E, Schrenzel J et al. Burden of bloodstream infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae determined using multistate modeling at a Swiss University Hospital and a nationwide predictive model. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013; 34:133-43.
15. DeAngelis G, Allignol A, Murthy A, Wolkewitz M, Beyersmann J, Safran E et al. Multistate modelling to estimate the excess length of stay associated with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in surgical patients. *Journal of Hosp Infect.* 2011;78:86-91

16. Aalen O, Johansen S. An empirical transition matrix for non-homogenous Markov chains based on censored observations. *Scan J Stat*; 1978;5:141-150
17. Datta S, Satten GA. Validity of the Aalen-Johansen estimators of stage occupation probabilities and Nelson-Aalen estimators of integrated transition hazards for non Markov models. *Statist Probabil Lett*. 2011;55:141-411
18. Efron B, Tibshirani R. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals and other measures of statistical accuracy. *Statist Sci*. 1986;1:54-77
19. Beyersmann J; Wolkewitz M, Allignol A, Grambauer N, Schumacher M. Application of multistate models in hospital epidemiology: advances and challenges. *Biom J*. 2011;53:332-350
20. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R, Montuori E, Leone F et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:498–504.
21. Lee SY, Kotapati S, Kuti JL et al. Impact of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: a matched cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006 ; 27 :1226-32.
22. Gandra S, Barter DM, Laxminarayan R. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clin Micro Inf*. 2014; 20: 973-979.
23. Worldbank data indicators. Available from: www.data.worldbank.org/indicator.
24. Burke RM, Rebolledo PA, Embrey SR, Wagner LD, Cowden CL, Kelly FM, Smith ER et al. The burden of pediatric diarrhea: a cross-sectional study of incurred costs and perceptions of cost among Bolivian families. *BMC Public Health*. 2013, 13:708.

25. Bhojani U, Thriveni BS, Devadasan R, Munegowda CM, Devadasan N, Kolsteren and Criel B. Out-of-pocket healthcare payments on chronic conditions impoverish urban poor in Bangalore, India. *BMC Public Health*. 2012;12:990.
26. Kruk ME, Goldmann E and Galea S. Borrowing and selling to pay for health care in a low and middle-income country. *Health affairs*. 2009, 28:1056-1066.
27. De Angelis G, Murthy A, Beyersmann J and Harbarth S. Estimating the impact of healthcare-associated infections on length of stay and costs. *Clin Micro Inf*. 2010;16 :1729-1735.
28. Beyersmann J, Kneib T, Schumacher M, Gastmeier P. Nosocomial infection, length of stay, and time-dependent bias. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009; 30:273–276.
29. M, Schumacher M. An easy mathematical proof showed that time-dependent bias is inevitably leads to biased effect estimation. *J Clin Epidemiol*. 2008 ; 61 :1216-1221.
30. Barnett AG, Beyersmann J, Allignol A, Rosenthal VD, Graves N, Wolkewitz M. The time-dependent bias and its effect on extra length of stay due to nosocomial infection. *Value Health*. 2011; 14:381–386.
31. Tumbarello M, Sali M, Trecarichi, Leone F, Rossie M, Fiori G et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3244-3252
32. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB and Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due

- to extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern Med*. 2005;165:1375-1380.
33. Organisation Mondiale de la Santé. Modèle pour l'auto-évaluation de la promotion et des pratiques d'hygiène des mains au niveau de l'établissement de soins.
34. Hilburn J, Hammond BS, Fendler EJ and Groziak PA. Use of alcohol hand sanitizer as an infection control strategy in an acute care facility. *American Journal of Infection Control*, 2003,31:109-116.
35. Cimiotti JP, Pierre PW and Larson EL. A cost comparison of hand hygiene regimes. *Nursing Economics*. 2004, 22:196-199.
36. Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C et al. Curbing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. *Arch Intern Med*. 2010; 170: 552–559.
37. African Patient Safety Program. Available from: www.who.int/patientsafety/implementation/apps/events/ABHR-workshop-report.pdf

Figure 1 Multistate model used for the excess length of stay analysis.

Every patient enters the model in state 1 on the day of admission, make a transition into state 2 at the time of infection (ESBL+ or ESBL-) then move to the 3 at the time of discharge or death. Control-patients, free of infection enter in state 1 and move to state 3 without transition through state 2.

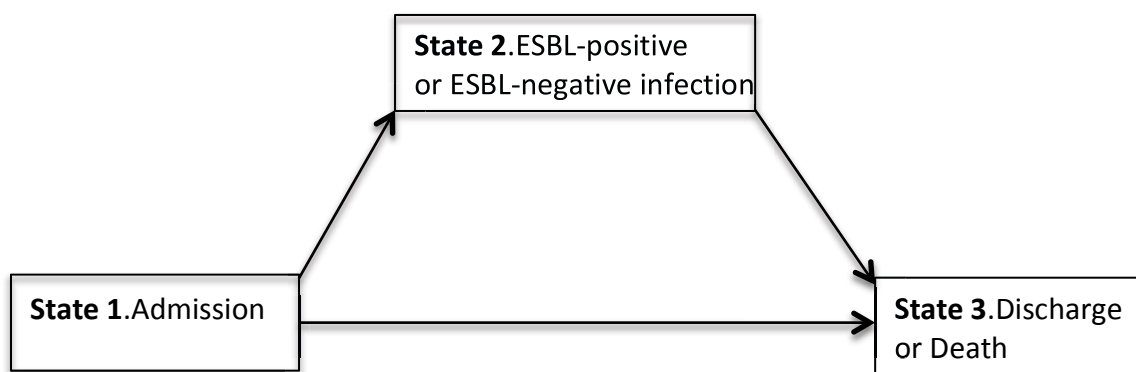


Table 1 Baseline characteristics of patients infected by *Enterobacteriaceae* producer of ESBL (ESBL-positive) and *Enterobacteriaceae* non-producer of ESBL (ESBL-negative)

Variable, n (%)	ESBL-Positive (n=110)	ESBL-Negative (n=76)	P-value
Demographics			
Male gender	68(61.8)	35(46.05)	0.037
Mean age, years (range)	26.3(20.9-31.7)	28.1(21.5-34.7)	0.665
Newborns (0-28 days)	22(20.0)	4(5.3)	0.005
Premature babies	12(10.9)	2(2.6)	0.046
Children (1 month-17 years)	37(33.6)	34(44.7)	0.167
Adults (up to 17 years)	51(46.4)	38(50.0)	0.656
Comorbidity			
Sickle cell disease	10(9.1)	7(9.2)	1
Malnutrition	10(9.1)	7(9.2)	1
AIDS	8(7.2)	2(2.6)	0.203
Diagnosis at admission			
Severe malaria	19(17.3)	7(9.2)	0.808
Gastroenteritis	16(14.5)	9(11.8)	0.666
Respiratory disease	25(22.7)	10(9.1)	0.127
Neurologic disorder	20(18.2)	12(15.8)	0.698
Meningitis	10(9.1)	5(4.5)	0.596
Tuberculosis	3(2.7)	3(3.9)	0.689
Cancer	10(9.1)	6(7.9)	1
Tetanus	4(3.6)	6(7.9)	0.321
Invasive procedure			
Surgical intervention	18(16.4)	18(23.7)	0.258
Parental nutrition	24(21.8)	6(7.9)	0.014
Mechanical ventilation	38(34.5)	7(9.2)	<0.0001
Central venous catheter	84(76.4)	35(46.0)	<0.0001
Urinary catheter	37(33.6)	13(17.1)	0.018
Type of infection			
Bloodstream infection	49(44.5)	20(26.3)	0.013
Urinary tract infection	36(32.7)	31(40.8)	0.279
Surgical site infection	13(11.8)	11(14.4)	0.656
Respiratory infection	5(4.5)	12(15.8)	0.016
Meningitis	7(6.4)	2(2.6)	0.313
Time to infection, in days (95%CI)			
All patients	8.2(6.4-9.9)	4.8(2.7-6.9)	0.007
Adults	11.3(8.8-13.8)	7.7(4.8-10.6)	0.029
Children	6.6(3.1-10.2)	2(1.2-5.2)	0.028
Newborns	3.5(2.2-4.8)	1(0.3-2.3)	0.059
Mean time after infection, days (95%CI)			
All patients	14.2(12.6-16.3)	9.3(7.4-11.1)	<0.0001
Adults	15.1(11.9-18.3)	8.9(7.2-10.6)	0.001
Children	15.5(12.3-18.7)	10(6.3-13.7)	0.013
Newborns	11.1(8.7-13.5)	6.2(5.8-13.0)	0.050
Inadequate antibiotherapy prescription	97(88.2)	14(18.4)	<0.0001

Table 2 Risk factors for fatal outcomes: results of univariate and multivariable analyses

Variable, n (%)	Fatal outcome		Univariate analysis			Multivariable analysis*		
	Yes (n=69)	No (n=117)	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
Demographics								
Male gender	34(49.3)	49(41.9)	1.3	0.7-2.4	0.361			
Mean age, years (range)	27.1(20.4-33.8)	26.9(21.6-32.3)			0.489			
Newborns (0-28 days)	16(23.2)	10(8.5)	3.2	1.4-7.5	0.008	4.5	2.4-37.8	0.025
Premature babies	9(13.0)	5(4.3)	3.4	1.1-9.9	0.042			
Children (1 month-17 years)	17(24.6)	54(46.1)	2.6	1.4-5.0	0.005			
Adults (up to 17 years)	36(52.2)	53(45.3)	1.3	0.7-2.4	0.448			
Comorbidity								
Sickle cell disease	6(8.7)	11(0.5)	0.5	0.3-2.5	1			
Malnutrition	4(5.8)	13(11.1)	0.5	0.5-1.5	0.296			
AIDS	3(4.3)	7(5.9)	0.7	0.2-2.6	0.747			
Diagnosis at admission								
Severe malaria	0(0)	19(16.2)	0.8	0.4-1.9	<0.0001			
Gastroenteritis	6(8.7)	19(16.2)	0.5	0.2-1.3	0.184			
Respiratory disease	18(26.1)	17(14.5)	2.1	0.9-4.3	0.079			
Meningitis	11(15.9)	4(3.4)	5.3	1.7-16.6	0.004	2.3	1.5-4.9	<0.0001
Tuberculosis	2(2.8)	4(3.4)	0.8	0-4.1	1			
Cancer	12(20.3)	4(3.4)	5.9	1.9-18.3	0.002	2.7	1.6-6.6	0.001
Neurologic disorder	8(11.5)	24(20.5)	0.5	0.2-1.2	0.159			
Invasive procedure								
Surgical intervention	15(21.7)	21(17.9)	1.3	0.6-2.6	0.567			
Parental nutrition	15(21.7)	15(12.8)	1.9	0.9-4.1	0.148			
Mechanical ventilation	28(40.5)	17(14.5)	3.9	1.9-7.9	0.0002	6.1	3.1-124.6	0.040
Central venous catheter	53(76.8)	66(56.4)	2.6	1.3-4.9	0.007			
Urinary catheter	14(20.3)	36(30.8)	0.6	0.3-1.1	0.128			
ESBL Production	52(75.4)	58(49.6)	3.1	1.6-5.9	<0.0001	5.3	3.1-19.9	0.008
Type of infection								
Bloodstream infection	31(44.9)	38(32.5)	1.7	0.9-3.1	0.116			
Urinary tract infection	18(26.1)	49(41.9)	0.5	0.2-0.9	0.039			
Meningitidis	7(10.1)	2(1.7)	6.5	1.5-25.7	0.014			
Surgical site infection	9(13.0)	15(12.8)	1.0	0.4-2.4	1			
Respiratory infection	4(6.8)	8(7.7)	0.8	0.2-2.7	1			
Inadequate antibiotherapy prescription	49(71.0)	62(52.9)	2.3	1.2-4.3	0.013			
Mean time to infection, days,(95%CI)	5.9(4.3-7.5)	7.3(5.4-9.3)			0.838			

Table 3: Estimation of the excess length of stay (LOS) and hazard ratios (HR) of end-of-LOS associated with ESBL-positive and ESBL-negative infection

	Excess LOS, days (95%CI)	End-of-LOS HR	
		Univariate (95% CI)	Multivariable (95% CI)
ESBL-positive infection ^a	7.9 (7.6-9.2)	0.29 (0.23-0.38)	0.32 (0.24-0.42)
ESBL-negative infection ^b	3.9 (3.8-4.6)	0.97 (0.75-1.24)	0.92 (0.71-1.20)

CI : confidence interval

^a**Model A** : Excess LOS due to ESBL-positive infection

110 patients with ESBL-positive infection versus 76 patients with ESBL-negative infection censored at time of infection and 186 patients free of infection

^b**Model B** : Excess LOS due to ESBL-negative infection

76 patients with ESBL-negative infection versus 110 patients with ESBL-positive infection censored at time of infection and 186 patients free of infection

Table 4: Mean cost related to ESBL-positive and ESBL-negative infection

Variable (in €)	ESBL-positive infection (95%CI)	ESBL-negative infection (95%CI)	Overcost due to ESBL (95%CI)	P-value
Antibiotic treatment cost	70	30	40	0.002
Hospital stay cost	120	60	60	<0.0001
Laboratory cost	25	25	-	-
Total cost (95%CI)	215(196-233)	115(103-125)	100 (78-125)	<0.0001

ANNEXE 3

**Epidemiology and burden of bloodstream infection caused by
Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in
a pediatric hospital in Senegal**

(Article soumis à la revue Plos One)

Acceptée pour publication

Epidemiology and burden of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in a pediatric hospital in Senegal

Awa Ndir^{1,2*}, Amadou Diop³, Pape Makhtar Faye³, Moussa Fafa Cissé³, Babacar Ndoye⁴, Pascal Astagneau⁵

1:PhD Program, Université Pierre Marie Curie, Paris, France ; **2:** Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal ; **3** Hôpital pour enfants Albert Royer, Dakar, Sénégal ; **4** National nosocomial infection program, Ministry of Health, Dakar, Sénégal ; **5** Universités Sorbonne Paris-Cité, Paris, France

*Corresponding author's email address : andir@pasteur.sn

Abstract

Context: Severe bacterial infections are not considered as a leading cause of death in young children in sub-Saharan Africa. The worldwide emergence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) could change the paradigm, especially in neonates who are at high risk of developing healthcare-associated infections. **Objective:** To evaluate the epidemiology and the burden of ESBL-E bloodstream infections (BSI). **Methods:** A case-case-control study was conducted in patients admitted in a pediatric hospital during two consecutive years. Cases were patients with *Enterobacteriaceae* BSI and included ESBL-positive (cases 1) and ESBL-negative BSI (cases 2). Controls were patients with no BSI. Multivariate analysis using a stepwise logistic regression was performed to identify risk factors for ESBL acquisition and for fatal outcomes. A multistate model was used to estimate the excess length of hospital stay (LOS) attributable to ESBL production while accounting for time of infection. Cox proportional hazards models were performed to assess the independent effect of ESBL-positive and negative BSI on LOS. **Results:** The incidence rate of ESBL-E BSI was of 1.52 cases/1000 patient-days (95% CI: 1.2-5.6 cases per 1000 patient-days). Multivariate analysis showed that independent risk factors for ESBL-BSI acquisition were related to underlying comorbidities (sickle cell disease OR=3.1 (95%CI: 2.3-4.9), malnutrition OR=2.0 (95%CI: 1.7-2.6)) and invasive procedures (mechanical ventilation OR=3.5 (95%CI: 2.7-5.3)). Neonates were also identified to be at risk for ESBL-E BSI. Inadequate initial antibiotic therapy was more frequent in ESBL-positive BSI than ESBL-negative BSI (94.2% versus 5.7%, $p<0.0001$). ESBL-positive BSI was associated with higher case-fatality rate than ESBL-negative BSI (54.8% versus 15.4%, $p<0.001$). Multistate modelling indicated an excess LOS attributable to ESBL production of 4.3 days. The adjusted

end-of-LOS hazard ratio for ESBL-positive BSI was 0.07 (95%CI, 0.04-0.12).

Conclusion: Control of ESBL-E spread is an emergency in pediatric populations and could be achieved with simple cost-effective measures such as hand hygiene, proper management of excreta and better stewardship of antibiotic use, especially for empirical therapy.

Introduction

Lower-middle-income countries account for over 75% of the 10.6 million annual deaths in children under five worldwide [1]. In Africa, the most frequent fatal outcomes stem from neonatal causes (26%), respiratory tract infections (21%), malaria (18%), diarrhea (16%) and HIV-infection (6%) [1]. Bacterial infections are often underreported among causes of child mortality in developing countries, the most frequently reported being upper respiratory tract infections. Bloodstream infections (BSI) are considered as a leading cause of severe bacterial infections in children. These severe sepses are challenging since the disease can progress rapidly to death if prompt effective antibiotic therapy is not undertaken. A few studies in Africa reported high case-fatality rate associated with BSI, mainly caused by Gram-negative bacteria, and being 2-fold higher than that of malaria (43.5% versus 20.2%) [2,3].

BSI are also absent from the World Health Organization estimates of the most frequently reported causes of deaths in neonates which are preterm (28%), sepsis or pneumoniae (26%) and asphyxia (23%) [4]. However, a recent report estimated the incidence of possible severe neonatal bacterial infections of about 6.9 million of annual cases and showed that they were a major contributor to mortality. Indeed they could cause up to one third of the 2.9 million neonatal deaths reported in lower-

middle-income countries (LMIC), which account for 99% of the annual worldwide neonatal deaths [4,5].

The worldwide increase of extended-spectrum beta-lactamases produced by *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) is worrisome in clinical practice since it may worsen the burden of severe sepsis of young infants in developing countries. Indeed, such highly resistant pathogens are usually isolated from healthcare-associated infections and are associated with poor outcomes [6-13]. The situation is even more alarming with the emergence of new mechanism of resistance reported in ESBL-E strains conferring resistance to carbapenems, which are drugs of last resort to treat ESBL-E infections [14].

Although previous studies already reported the existence of ESBL-E in several African countries, the extent of the ESBL-E epidemic, as well as its determinants and outcomes have been poorly evaluated until now. Based on a clinical study conducted in a large pediatric center in Dakar, Senegal, we aim to determine the epidemiological aspects and estimate the clinical burden of ESBL-E infections in young hospitalized infants.

Materials and methods

Study design and population

Albert Royer Children's hospital is the referral tertiary-care teaching pediatric hospital in Dakar accounting for 5,000 admissions per year with 120 beds of neonatal, pediatric and surgical activity. A case-case-control study nested in a cohort was conducted including all patients admitted at hospitals during a two-year period (January 1, 2012 to December 31, 2013). Patients from whom an *Enterobacteriaceae* was recovered from a blood sample, drew in case of infection suspicion, were eligible

to be included in the cohort study. Only hospital-acquired (HA) BSI caused by *Enterobacteriaceae* strains were considered for data analysis. Indeed, patients with a community-acquired and those with a BSI caused by a bacterial other than an *Enterobacteriaceae* were excluded of the study. The date of BSI onset was the date of collection of the first blood sample yielding an *Enterobacteriaceae* strain. If a bacterial strain was isolated on several occasions, only the first isolation was considered.

Cases were patients with a HA-BSI caused by an *Enterobacteriaceae* and included two subgroups of inpatients: those with ESBL-positive BSI and those with ESBL-negative BSI. Controls were patients who did not experience an infection during the study period and were randomly selected from the hospital database system. Patients who did not have a diagnostic sample drawn during the hospital stay were eligible to be included in the group of control-patients. Among them, patients who did not have a clinical sign of systemic infection and antibiotic prescriptions during the hospital stay were included in the group of control-patients. For each case-patient two control-patients admitted on the same day and in the same unit were selected.

All patients included in the study were followed from admission to discharge or in-hospital death. For each study patient, the following variables were collected: gender, age, germs isolated, resistance profile, underlying comorbidities, diagnosis at admission, interventions related to patient care such as surgical intervention and invasive procedures, length of stay (LOS), date of BSI onset, in-hospital mortality and antibiotics prescribed empirically.

Definitions

A BSI was suspected in the presence of fever ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), hypothermia ($< 36^{\circ}\text{C}$) and other signs of systemic inflammatory response syndrome as detailed in the WHO guideline of the Integrated Management of Childhood Illness [15]. A blood sample was drawn from all inpatients with a suspected BSI. A BSI was defined by the presence of a bacterial strain recovered from blood samples. The infection was considered as hospital acquired if bacterial strain was recovered from blood samples drew at least 48h after the admission of patients and at least 72h after admission of neonates (aged between 1-28 days of life). BSI was considered as community-acquired if bacterial strain was recovered from blood samples drew within the 48h after admission (72h for neonates) and if the patient was not referred from another hospital, otherwise the infection was considered as hospital-acquired.

BSI was defined as ESBL-positive when the blood sample yielded an ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and ESBL-negative when the strain isolated was an *Enterobacteriaceae* susceptible to beta-lactams.

Antibiotic therapy was defined as empirical if prescribed initially before susceptibility test results were available. Empirical antibiotic therapy was considered inadequate when the initial antibiotic drug prescribed was not active against the pathogen causing the infection.

Microbiological methods

Enterobacteriaceae strains were identified with API 20E strips (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Minimum inhibitory concentration was not determined to define drug activity. Susceptibilities against antimicrobial agents and the ESBL production was routinely detected by the double disc diffusion method using antibiotic discs of

cefepime, cefotaxime and ceftazidime placed at a distance of 30 mm around a disc of clavulanic acid as recommended by the Antibioqram Committee of the French Microbiology Society [16].

Statistical analysis

Continuous variables were compared using Wilcoxon rank sum test or Student's t test if appropriate. In case of non-homogeneity of variances, the 2-tailed test was done by default and the Welch correction was applied. Fisher's exact test was used for the comparison of categorical variables. To evaluate risk factors to acquire an ESBL-E BSI 2 multivariate models were tested using a backward stepwise logistic regression analysis including all variables with a p-value less than 0.20 in the univariate analysis. Patients with ESBL-positive BSI were compared with patients with ESBL-negative BSI in model 1 then, compared with control-patients (uninfected patients) in model 2. A multivariate analysis using a backward stepwise logistic regression analysis was also performed to assess the risk factors for fatal outcomes. P value less than 0.05 was considered as significant in the whole analysis.

A multistate model was used to estimate the excess LOS attributable to ESBL production [17,18]. The occurrence of BSI (whether ESBL-positive or ESBL-negative) was the time-dependent exposure, while discharge (alive or dead) was the study endpoint (Fig.1). Non-parametric estimation of transition probabilities between states was performed using the Aalen-Johansen estimator [18-20]. The mean difference in LOS was computed for each day of the interval, as the difference between the estimated LOS given the intermediate state had been reached or not up to that day. The excess LOS attributable to ESBL production was the difference between LOS

due to ESBL-positive and LOS due to ESBL-negative BSI. When assessing the LOS due to ESBL-positive BSI, patients with ESBL-positive BSI were compared to patients who did not experience a BSI during hospital stay and patients with ESBL-negative BSI but the latter were administratively censored from the date of their infection. Likewise, patients with ESBL-positive BSI were administratively censored when assessing the LOS due to ESBL-negative BSI. Standard errors and confidence intervals were calculated by 500 bootstrap resampling runs.

To assess the independent effect of ESBL-positive and ESBL-negative BSI on LOS, they were evaluated as time-dependent covariates using multivariate Cox regression analysis to estimate the end-of-LOS hazard ratio (HR). Variables for adjustment included age, newborn, malnutrition, sickle cell disease and mechanical ventilation.

LOS analysis was performed using R, version 2.15.3, an open-source language for statistical computing and graphics. All other analysis were performed using Stata software, release 13.0.

Ethical considerations

The medical advisory board of Albert Royer Hospital approved this retrospective study. All data collected were anonymized prior to analysis.

Results

Characteristics of the study patients

During the study period, blood samples were drawn from 1,800 patients with suspected BSI of which 173 (10%) yielded a bacterial strain. Contaminants were found in 36.8% of blood cultures (Fig.2). BSI was hospital-acquired (HA) in 81.5% of

cases (n=141). The epidemiology of bacterial strains involved in BSI cases described in table 1 showed that *Enterobacteriaceae* was mainly recovered from blood cultures. Besides, ESBL-E was the major resistant strain isolated and was more frequent in hospital than community-acquired BSI (59.6% versus 34.4, $p=0.010$) (Table 1).

The overall incidence rate of HA-BSI caused by ESBL-E strains was of 1.52 cases / 1000 patient-days (95% CI: 1.2-5.6 cases per 1000 patient-days). ESBLs were produced by 88% of *Enterobacter spp* isolates, 82% of *Klebsiella spp* isolates and 58.3% of *E.coli* isolates (Table 2).

Characteristics of case-patients (n=110) and controls (n=220) are detailed in table 3. Cases were constituted of 84 patients with ESBL-positive BSI and 26 patients with ESBL-negative BSI (Table 3).

Risk factors for ESBL-E BSI

Univariate analysis presented in table 3 showed that patients with ESBL-positive BSI were significantly younger than patients with ESBL-negative BSI (2.5 years versus 4.4 years, $p=0.021$). Besides, they were more likely to suffer from sickle cell disease (33.3% versus 11.5%, $p=0.044$), to be malnourished (38.1% versus 15.4%, $p=0.034$) and to be under mechanical ventilation (63.1% versus 38.5%, $p=0.040$) than ESBL-negative BSI. Same differences were observed when comparing patients with ESBL-positive BSI with control-patients (Table 3). Additional factors related to healthcares, such as parenteral nutrition and the use of catheter, were significantly more frequent in patients with ESBL-positive BSI than in control-patients (Table 3). Multivariate analyses performed in model 1 and model 2 indicated that independent risk factors for ESBL-E BSI acquisition were: to be a newborn (OR=11.4, 95%CI: 5.7-198, $p=0.041$), having a sickle cell disease (OR=3.1, 95%CI:

2.3-4.9, $p<0.0001$), being malnourished (OR=2.0, 95%CI: 1.7-2.6, $p<0.0001$), and being under mechanical ventilation (OR=3.5, 95%CI: 2.7-5.3, $P<0.0001$) (Table 4).

Antimicrobial prescriptions

All patients with BSI received an empirical antimicrobial therapy, which was mainly a third generation cephalosporin (90%). Initial antibiotic therapy was inadequate to treat 79.1% of BSI infections ($n=87$). Inadequate initial antibiotic therapy (IIAT) was more frequent in ESBL-positive BSI than in ESBL-negative BSI (94.2% versus 5.7%, $p<0.0001$). Besides, patients who received an IIAT were more likely to have a fatal outcome (92% versus 8%, $p=0.0019$) and a longer hospital stay (22.9 days versus 14.2 days, $p=0.013$) than patients who received an adequate empirical therapy.

Fatal outcomes

Fifty patients with a BSI caused by an *Enterobacteriaceae* died during the study period (45.4%). The case-fatality rate was significantly higher in ESBL-positive BSI (54.8%) than in ESBL-negative BSI (15.4%) ($p<0.001$). Univariate analysis showed that fatal outcomes more frequently occurred in young children, in newborns and patients being under mechanical ventilation (Table 5). Additionally, patients who died were more likely to have an ESBL-E BSI and to receive an inadequate initial antibiotic therapy than patients who survived. In the multivariate analysis, ESBL production remained the significant independent risk factor for death (OR= 2.9, 95% CI: 1.8-7.3, $p=0.001$).

Length of stay (LOS)

The mean LOS for patients with ESBL-positive BSI and ESBL-negative BSI was 22.5 days (95%CI: 18-5-26. days) and 12.6 days (95%CI: 9.5-15.8 days) respectively ($p<0.0001$). The results of the multistate model showed an excess LOS attributable to ESBL production of 4.3 days (Table 6). Besides, ESBL-positive BSI significantly reduced hazard of discharge (dead or alive) after adjustment for confounding (HR=0.07, [95%CI, 0.04-0.12]) and consequently prolonged LOS.

Discussion

Our study highlights an alarming rate of ESBL production among *Enterobacteriaceae* strains associated with BSI. In addition, a significant part of ESBL-E BSI was severe sepsis associated with fatal outcome and prolonged hospital stay. We have estimated an incidence rate of ESBL-E BSI of 1.52 cases / 1000 patient-days which is higher than those reported through the national surveillance of multidrug-resistant bacteria in France where ESBL-E rate is increasing dramatically since 2003 (0.054/1000 patients-days in 2012) [21,22]. Besides, this ESBL-E incidence is higher than that previously reported in one African healthcare setting [2]. However, the paucity of studies on childhood ESBL-E BSI from Africa does not allow a thorough comparison. To our knowledge, our study is the only one on this topic in sub-Saharan Africa since a Tanzanian study published ten years ago that had much narrower scope [23].

The high rate of ESBL-E strains we have found should be interpreted with caution. Indeed, when an infection is first suspected in primary care settings antibiotic drugs are frequently prescribed without drawing any biological samples since

microbiology laboratories are not available in these settings. Thus, patients admitted at hospital if no recovery is observed may receive antibiotic drugs, especially 3rd generation cephalosporins, prior to the hospital admission. In contrast, when an infection was suspected in the hospital study, blood samples were drawn systematically before the initiation of the antibiotherapy. Antibiotic prescriptions prior to blood culture, also reported in another African country [2], may be a selection factor of resistant strains and may limit the detection of susceptible strains. Therefore, the overuse of antibiotic drugs prior to hospital admission may explain the low rate of positive blood cultures we found (10%) and may bias the proportion of ESBL strains. Antimicrobial therapy before hospital admission has already been reported as a major risk factor for ESBL-E acquisition [24-27]. Unfortunately, prescriptions prior to admission were not available in the patients' medical files and were not collected in our study.

The high incidence rate of ESBL-E BSI also raises the issue of the choice of 3rd generation cephalosporins as systematic empirical treatment. Indeed, empirical antimicrobial therapy was found inadequate to treat the majority of BSI and was more frequent in ESBL-positive BSI than in ESBL-negative BSI. Reports about inadequate initial antibiotherapy in children in Africa are scarce. However, consistent with other studies, we demonstrated that inadequate initial antibiotic therapy (IIAT) was associated with increased case-fatality rate and prolonged hospital stay [28-34]. Therefore, knowledge of the local bacterial epidemiology and their susceptibility patterns is crucial for clinicians and should guide empirical antibiotic therapy prescription. Beta-lactams could therefore be used after determination of antibiotic drug activity. Furthermore, since genes encoding ESBL and other resistance to

commonly used antibiotics such as fluoroquinolones are often on the same mobile DNA element, the multidrug-resistant phenotype of ESBL-producing bacteria limits effective therapeutic options and causes a delay in initiating adequate antimicrobial therapy [28,29,32]. In resource-poor countries, some factors such as the lack of functional microbiology laboratory for pathogens detection may hamper the prompt initiation of adequate therapy crucial to treat BSI. When microbiology laboratory exists, mostly in referral tertiary care hospitals, bacteriological results are not available quickly enough to adjust empirical therapy. Additionally, expensive effective therapies to treat ESBL-E infections such as carbapenems are mostly unavailable or beyond the financial reach of most patients living in Senegal.

To our knowledge, risk factors for ESBL-BSI acquisition in children have not been assessed previously in lower-middle-income countries. Using a case-case-control study, we identified several risk factors specifically related to ESBL-E BSI including some related to the underlying disease and others to healthcare procedures. The case-case-control study design is considered to be the most appropriate method when assessing risk factors specific of antibiotic-resistant pathogen acquisition without introducing a potential selection bias [35-38]. Patients who suffered from sickle cell disease or malnutrition were found at risk to acquire an ESBL-E BSI. We also found that being under mechanical ventilation was a risk factor for ESBL-E BSI suggesting a cross-transmission of pathogens. Newborns were also identified as patients at risk to acquire an ESBL-E BSI. This may be explained by their immature immune systems and the overly intensive cares they received, especially for pre-term or low birthweight neonates. ESBL strains may be transmitted from mothers to newborns during delivery; however further studies are required to

determine the association between the mother's colonization and the acquisition of an ESBL-infection by neonates. Poor conditions of clinical cares could also increase this risk. Thus, particular attention should be given to newborns during and after delivery, and during nursing cares. To prevent the transmission of ESBL isolates, training of healthcare workers on standard precautions, such as hand hygiene, should be reinforced as recommended [39-41]. Infection control programs particularly focused on hand hygiene was showed effective to decrease the rate of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains [39]. However additional control measures specifically targeting ESBL strains should be implemented. These measures should focus on the management of excreta since the main reservoir of *Enterobacteriaceae* strains is the human digestive tract.

We also showed a prolonged LOS of 4.3 days attributable to ESBL production. To estimate this excess LOS we used a multistate model, a statistical approach which treats the occurrence of BSI as time-dependent and takes into account competing events thereby avoiding the time-dependent bias inherent in other commonly used statistical methods [17,20,42-45]. Indeed, if the occurrence of the BSI is not explicitly modeled as time-dependent, its impact on length of stay and consequently on hospital costs will inevitably be overestimated [43,44,46]. Our study confirms that multistate modelling is a suitable approach since we found an excess LOS attributable to ESBL production of 4.3 days while taking into account time of infection compared to an excess LOS of 9.9 days using standard technics.

The economic impact of ESBL-E BSI was not the purpose of the present study, however it has been demonstrated elsewhere that the excess length of stay is one main driver of hospital costs and that hospital bed-day cost could represent almost

60% of their total cost [47,48]. Therefore, using the average bed-day hospital cost we estimated from the patient perspective an extra-cost of 75 euros due to the excess LOS attributable to ESBL-E production. This additional cost is substantial given Senegal's LMIC status where it is close to the mean monthly salary of 87 euros [49]. This estimated financial burden of ESBL-E BSI would be substantially higher if antibiotic therapy were included, especially if this therapy consisted of the costly carbapenems, which remain the only antibiotic therapy effective to treat ESBL-E infections.

Acknowledgments

We gratefully thank the administrative department of Albert Royer Hospital for their contribution for the data collection. We also thank Vincent Richard for his critical review of the manuscript.

References

1. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE and the WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005; 365:1147–1152.
2. Bloomberg B, Manji KP, Urassa WK, Tamin BS, Mwakagile DM, Jureen R et al. Antimicrobial resistance predicts death in Tanzanian children with bloodstream infections: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 43.

3. Aiken AM, Mturi N, Njuguna P, Mohammed S, Berkeley JA, Mwangi I et al. Risk and causes of paediatric hospital-acquired bacteraemia in Kilifi District Hospital, Kenya: a prospective cohort study. *Lancet*. 2011; 378: 2021–27.
4. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. Four million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet*. 2005; 365:891–900.
5. Seale, AC, Blencowe H, Manu AA, Nair H, Bahl R, Qazi SA et al. Estimates of possible severe bacterial infection in neonates in sub-Saharan Africa, south Asia, and Latin America for 2012: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014; 14: 731 – 741
6. Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6: 671–683.
7. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y; ReAct-Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:813-821.
8. Tumbarello M, Spanu T, Di Bidino R, Marchetti M, Ruggeri M, Trecarichi EM et al. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of extended-spectrum beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 4085–4091.
9. Anderson DJ, Engemann JJ., Harrell LJ, Carmeli Y, Reller LB and Kaye KS. Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 5:1715–1720.
10. Kim BN, Woo JH, Kim MN, Ryu J, and Kim YS. Clinical implications of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Journal Hosp Infect*. 2002; 52:99-106.

11. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH, and Kim EC. Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46:1481-1491.
12. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH and Fishman NO. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1162-1171.
13. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D and Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:1257–1262.
14. Nordmann P, Naas T and Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011; 10:1791-1798.
15. Young Infants Clinical Signs Study Group. Clinical signs that predict severe illness in children under age 2 months: a multicenter study. *Lancet* 2008; 371: 135–42
16. Société Française de Microbiologie. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Comité de l'antibiothérapie de la Société Française de Microbiologie. Recommendations. 2015. Available from: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf.
17. Stewardson A, Fankhauser C, De Angelis G, Rohner P, Safran E, Schrenzel J et al. Burden of bloodstream infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* determined using multistate

modeling at a Swiss University Hospital and a nationwide predictive model.
Infect Control Hosp Epidemiol. 2013; 34:133-43.

18. Green N, Johnson AP, Henderson KL, Muller-Pebody B, Thelwall, S, Robotham JV et al. Quantifying the burden of hospital-acquired bloodstream infection in children in England by estimating excess length of hospital stay and mortality using a multistate analysis of linked routinely collected data. J Ped Infect Disease. 2014:1-8.
19. Aalen O, Johansen S. An empirical transition matrix for non-homogeneous Markov chains based on censored observations. Scand J Stat 1978;5:141-150.
20. Beyersmann J, Wolkewitz M, Allignol A, Grambauer N, Schumacher M. Application of multistate models in hospital epidemiology: advances and challenges. Biom J. 2011;53:332-350
21. Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, Marty N, Dumartin C, Bertrand X et al. on behalf of the MDRB Surveillance National Steering Group (BMR-Raisin). National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network : a 9 year experience. J Antimicrob Chemother. 2013 ; 68:954-959.
22. Réseau d'alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Résultats 2011.
Available from : <http://www.cclinparisnord.org/BMR/BMR2011.pdf>
23. Blomberg B, Jureen R, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile DS, Urassa WK et al. 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 Micro*. 2005, 43:745-749.
24. Kaya O, Akcam FZ, Gonen I, Unal O and Ceylan T. Risk factors for bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a Turkish hospital. *J Inf Dev Countries*. 2013;7:507-512.
 25. Pena C, Pujol M, Ricart A, Ardanuy C, Ayats J, Linares J et al. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect*. 1997; 35:9–16.
 26. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R, Montuori E, Leone F et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:498–504.
 27. Tsai MH, Chu SM, Hsu JF, Lien R, Huang HR, Chiang MC et al. Risk Factors and outcomes for multidrug-resistant gram-negative bacteremia in the NICU. *Pediatrics*. 2014;133:e322-e329.
 28. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Fishman NO, Bilker WB et al. Risk factors for Increasing multidrug resistance among Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 1317-1324.
 29. Paterson DL, Bonomo R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18:657–686.
 30. Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2000; 3: S131-S138
 31. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by

- extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:1987–1994
32. Tumbarello M, Sali M, Trecarichi EM, Leone F, Rossi M, Fiori B et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*: risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:3244–3252.
33. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB et Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern Med* 2005; 165:1375–1380
34. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteremia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60: 913–920.
35. Zavascki AP. Assessing risk factors for acquiring antimicrobial-resistant pathogens: a time for a comparative approach. *Clin Infect Dis.* 2004;39:871-872.
36. Harris AS, Kaye SK and Carmeli Y. Reply to Zavaski. *Clin Inf Dis.* 2004; 39:872-873
37. Kaye KS, Harris AD, Gold H, Carmeli Y. Kaye KS, Engemann JJ et al. Reference group choice and antibiotic resistance outcomes. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10:1125–1128.

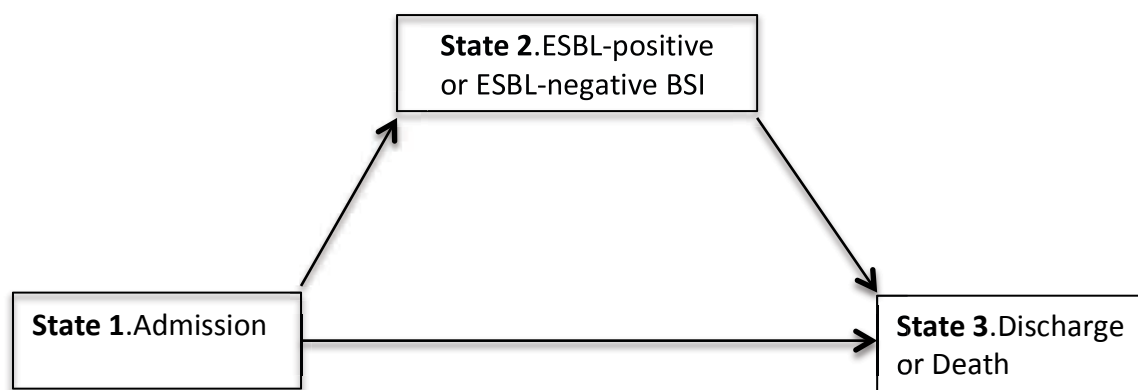
38. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y, Samore MH. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. Clin Infect Dis. 2001; 32:1055–61.
39. Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C et al. Curbing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. Arch Intern Med 2010; 170: 552–559.
40. Haut Conseil de la Sante Publique. Recommandations relatives aux mesures à mettre en oeuvre pour prévenir l'émergence des Entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination – Propositions rédigées dans l'optique de définir un programme national de prévention. 2010.
- Available from :
http://www.hcsp.fr/explore.cgi/hcspr20100202_enterobactBLSE
41. Surveillance and prevention of healthcare-associated infections. French national guidelines.
- Available from: http://www.sf2h.net/SF2H_english/SF2H_surveillance-and-prevention-guidelines-2010.pdf
42. De Angelis G, Murthy A, Beyersmann J and Harbarth S. Estimating the impact of healthcare-associated infections on length of stay and costs. CMI. 2010;16 :1729-1735.
43. Beyersmann J, Kneib T, Schumacher M, Gastmeier P. Nosocomial infection, length of stay, and time-dependent bias. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30:273–276.
44. Beyersmann J, Gastmeier P, Wolkewitz M, Schumacher M. An easy mathematical proof showed that time-dependend bias is inevitably leads to biased effect estimation. J Clin Epidemiol. 2008 ; 61 :1216-1221.

45. Beyersmann J, Wolkewitz M, Schumacher M. The impact of time-dependent bias in proportional hazards modelling. *Stat Med.* 2008; 27:6439-54.
46. Barnett AG, Beyersmann J, Allignol A, Rosenthal VD, Graves N, Wolkewitz M. The time-dependent bias and its effect on extra length of stay due to nosocomial infection. *Value Health* 2011; 14:381–386.
47. Brun Buisson C, Roudot-Thoraval F, Girou E, Grenier-Sennelier C and Durand-Zaleski I. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med.* 2003; 29:1464–1471
48. Lee SY, Kotapati S, Kuti JL, Nightingale CH and Nicholau DP. Impact of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: a matched cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 27: 1226-32.
49. World Bank data. Available from: www.data.worldbank.org/indicator.

Figure Captions

Fig.1 Multistate modelling used for the excess length of stay analysis

Patients enter the model in state 1 at hospital admission, make a transition into state 2 at the time of infection (whether ESBL-positive or ESBL-negative BSI) then move to the absorbing state 3 at the time of discharge or death. Patients who do not experience an infection during their hospital stay move directly from state 1 to state 3.

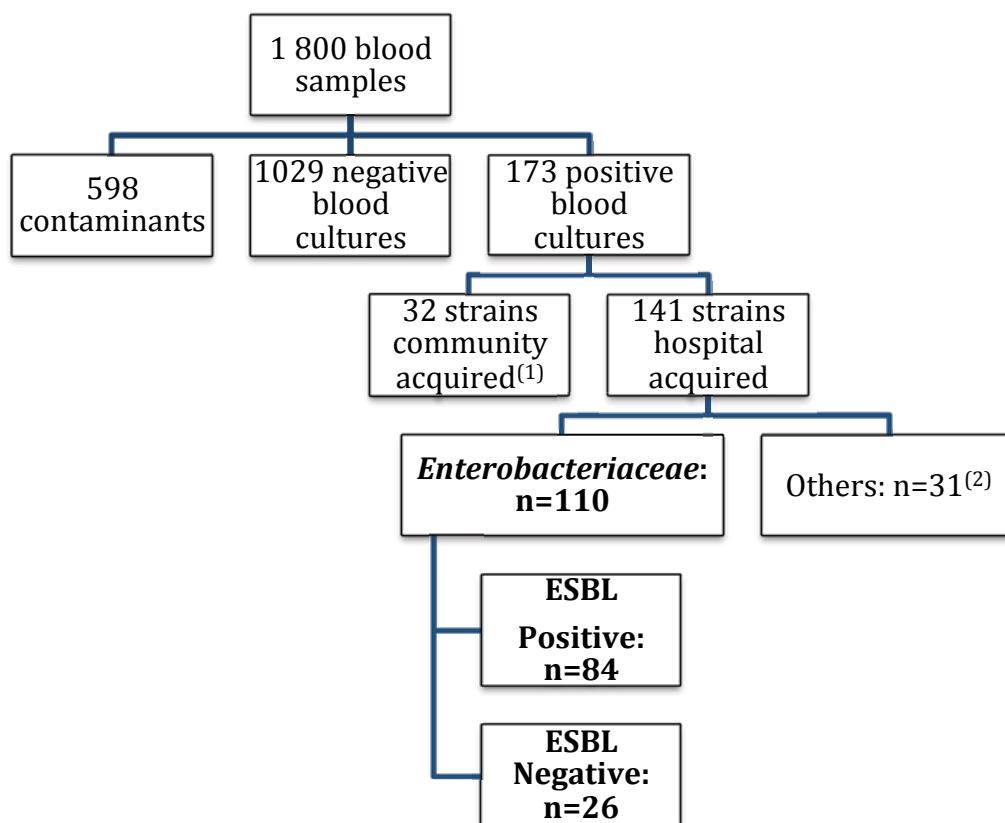


BSI: Bloodstream infection

ESBL-positive: *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamase

ESBL-negative: *Enterobacteriaceae* susceptible to beta-lactams

Fig.2 Flow diagram of study patients' selection



(1): Strains associated with community-acquired BSI: *Enterobacteriaceae* (21), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Staphylococcus spp* (6), *Streptococcus spp* (3)

(2) : Strains associated with hospital-acquired BSI : *Pseudomonas aeruginosa* (6), *Staphylococcus aureus* (22), *Streptococcus spp* (3)

List of tables

Table 1 : Characteristics of the study patients with community and hospital-acquired bloodstream infections (n=173 patients)

Characteristics	TOTAL (n=173)	Source of the infection		P value
		Hospital- acquired BSI (n=141)	Community- acquired BSI (n=32)	
Demographics				
Male Sex	91(52.6)	71(50.3)	20(62.5)	0.243
Mean, years (range)	3.3(0-17)	3.3 (0-16)	3.6(0-17)	0.214
Unit of hospitalization				
Pediatrics	108(62.4)	89(63.1)	19(59.4)	0.687
Surgery	29(16.8)	22(15.6)	7(21.9)	
Neonatology	36(20.8)	30(21.3)	6(18.7)	
Pathogens isolated, n (%)				
Enterobacteriaceae	131(75.7)	110 (78.1)	21(65.6)	0.182
Pseudomonas aeruginosa	8(4.6)	6(4.2)	2(6.2)	
Staphylococcus aureus	28(16.2)	22(15.6)	6(18.7)	
Streptococcus	6(3.5)	3(2.1)	3(9.4)	
Resistant strains				
ESBL-E	95(54.9)	84(59.6)	11(34.4)	0.010
MRSA	2(1.1)	2(1.4)	0(0)	

ESBL-E: Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Table 2: Proportion of ESBL producing *Enterobacteriaceae* among hospital-acquired BSI (n=110 patients)

Pathogens	Number of isolates	ESBL-E ^a
	n (%)	n (%)
<i>Enterobacter spp</i>	50(45.5)	44(88.0)
<i>Klebsiella spp</i>	40(36.4)	33(82.5)
<i>Escherichia coli</i>	12(10.9)	7(58.3)
<i>Salmonella spp</i>	4(3.6)	0
<i>Citrobacter freundii</i>	2(1.8)	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2(1.8)	0
Total	110 (100.0)	84(76.4)

^a Proportion of ESBL strains per species (percentages were calculated by row)

Table 3: Factors associated with ESBL-E BSI: results of univariate analyses comparing ESBL-positive BSI with ESBL-negative BSI (model 1) and ESBL-positive BSI with control-patients (model 2)

Variable, n (%)	ESBL+ (n=84)	ESBL – (n=26)	Controls (n=220)	P-value 1 ^a	P-value 2 ^b
Demographics					
Male	44(52.4)	14(53.8)	111(50.4)	1	0.798
Mean age, years	2.5	4.4	3.7	0.021	0.016
Newborn	27(32.1)	2(7.7)	48(21.9)	0.012	0.074
Prematurity	7(8.3)	2(7.7)	4(1.8)	1	0.012
Comorbidity					
Sickle cell disease	28(33.3)	3(11.5)	7(3.2)	0.044	<0.0001
Malnutrition	32(38.1)	4(15.4)	9(4.1)	0.034	<0.0001
Severe anemia	16(19.0)	8(30.8)	31(14.1)	0.276	0.291
Diagnosis at admission					
Severe malaria	11(13.1)	4(15.4)	34(15.4)	0.750	0.719
Gastroenteritis	4(4.8)	8(30.8)	65(29.5)	0.0009	<0.0001
Respiratory disease	25(29.8)	8(30.8)	40(18.2)	1	0.041
Cardiovascular disease	3(3.5)	1(3.8)	4(1.8)	1	0.399
Meningitis	5(5.9)	1(3.8)	7(3.2)	1	0.323
Ear, nose and throat disease	10(11.9)	3(11.5)	24(10.9)	1	0.839
Invasive procedure					
Surgical intervention	15(17.8)	5(19.2)	36(16.4)	1	0.734
Parenteral nutrition	24(28.6)	10(38.5)	22(10.0)	0.343	<0.0001
Mechanical ventilation	53(63.1)	14(38.5)	32(14.5)	0.040	<0.0001
Catheter	45(53.6)	11(42.3.)	16(7.3)	0.373	<0.0001
Blood transfusion	16(19.0)	3(11.5)	12(5.5)	0.554	0.0006

^a P-value 1 refer to model 1 in which ESBL-positive BSI are compared with ESBL-negative BSI

^b P-value 2 refer to model 2 in which ESBL-positive BSI are compared with control-patients (uninfected patients)

Table 4: Risk factors for ESBL-E BSI acquisition: results of multivariate analyses

Variable including in models	Initial Model 1 ^a	Initial Model 2 ^b	Final Model 1 ^a		Final Model 2 ^b			
	P-value	P-value	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
Newborn	0.012	0.074	2.8	1.9-60	<0.0001	11.4	5.7-198	0.041
Prematurity	-	0.012	-	-	-	4.7	2.5-41.8	0.027
Sickle cell disease	0.044	<0.0001	3.8	2.3-10.3	0.002	3.1	2.3-4.9	<0.0001
Malnutrition	0.034	<0.0001	2.8	1.9-5.3	<0.0001	2.0	1.7-2.6	<0.0001
Parenteral nutrition	-	<0.0001	-	-	-	9.6	4.9-98	0.039
Mechanical ventilation	0.025	<0.0001	6.1	3.1-228.9	0.044	3.5	2.7-5.3	<0.0001
Catheter	0.170	<0.0001				4.0	2.9-6.7	<0.0001
Blood transfusion	0.149	0.0006						

Multivariate analyses were performed using a backward stepwise logistic regression including variables with a $p < 0.20$ in the univariate analyses (Table 3). P -value < 0.05 was considered as statistically significant.

^a**Model 1:** ESBL-positive BSI versus ESBL-negative BSI

^b**Model 2:** ESBL-positive BSI versus control-patients (uninfected patients)

Table 5: Factors associated with fatal outcomes: results of univariate and multivariate analysis

Variable, n (%)	Fatal outcome		Univariate analysis			Multivariate analysis*		
	Yes (n=50)	No (n=60)	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value
Demographics								
Male	24(48)	28(46.7)	1.1	0.5-2.2	1			
Mean age, years	1.5	4.2			0.0003			
Newborn	19(38)	10(16.7)	3.1	1.3-7.3	0.016			
Prematurity	6(12)	3(5)	2.6	0.7-9.9	0.295			
Comorbidity								
Sickle cell disease	13(26)	18(30)	0.8	0.3-1.9	0.676			
Malnutrition	18(36)	18(30)	1.3	0.6-2.9	0.545			
Severe anemia	10(20)	14(23.3)	0.8	0.3-2.0	0.817			
Diagnosis at admission								
Severe malaria	7(14)	8(13.3)	1.1	0.4-3.1	1			
Gastroenteritis	1(2)	11(18.3)	0.1	0-0.6	0.006			
Respiratory disease	19(38)	14(23.3)	2.0	0.9-4.6	0.101	3.0	1.4-17.6	0.093
Cardiovascular disease	2(4)	2(3.3)	1.2	0.2-7.1	1			
Meningitis	5(10)	1(1.7)	6.5	0.9-1.2	0.090			
Ear, nose and throat disease	6(12)	7(11.7)	1.0	0.3-3.1	1			
Invasive procedure								
Surgical intervention	7(14)	13(21.7)	0.6	0.2-1.6	0.332			
Parenteral nutrition	12(24)	22(36.7)	0.5	0.2-1.2	0.214			
Mechanical ventilation	35(70)	28(46.7)	2.7	1.2-5.8	0.019	6.5	2.9-34.4	0.098
Catheter	27(54)	29(48.3)	1.2	0.5-2.6	0.572			
Blood transfusion	9(18)	10(16.7)	1.1	0.4-2.9	1			
ESBL Production	46(92)	38(63.3)	6.6	2.2-20.0	0.0006	2.9	1.8-7.3	0.001
Inadequate initial antibi	46(92)	41(68.3)	5.3	1.7-16.1	0.002			

*Multivariate analyses was performed using a backward stepwise logistic regression including variables with a p <0.20 in the univariate analyses. P-value <0.05 was considered as statistically significant.

Table 6: Estimation of the excess length of stay (LOS) and hazard ratios (HR) of end-of-LOS associated with ESBL-positive and ESBL-negative BSI.

	Excess LOS (95%CI), days)	End-of-LOS HR	
		Univariate (95% CI)	Multivariate (95% CI)
ESBL-positive BSI ^a	5.1 (3.82-5.62)	0.18 (0.13-0.24)	0.07 (0.04-0.12)
ESBL-negative BSI ^b	0.8 (0.74-1)	0.66 (0.44-0.99)	0.12 (0.07-0.21)

CI : confidence interval

^a**Model A** : Excess LOS due to ESBL-positive BSI

Cases: ESBL-positive BSI (n=84)

Controls: ESBL-negative BSI (n= 26) censored at time of infection + control-patients (uninfected patients) (n=220)

^b**Model B** : Excess LOS due to ESBL-negative BSI

Cases: ESBL-negative BSI (n=26)

Controls: ESBL-positive BSI (n= 84) censored at time of infection + control-patients (uninfected patients) (n=220)