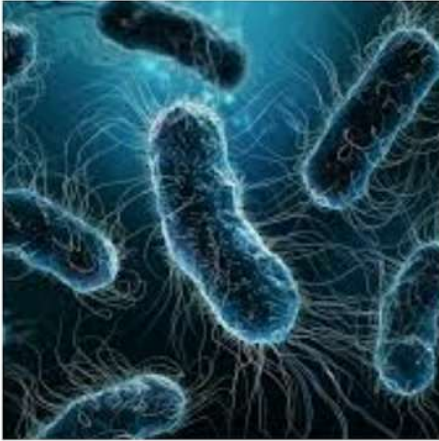


# INTOXICATION !

## E. COLI A INFECTÉ 42 PERSONNES DANS 12 ÉTATS DIFFÉRENTS



### Une épidémie d'E. coli

Une épidémie d'E. coli a infecté 42 personnes dans 12 États différents. Les personnes hospitalisées ont présenté de graves symptômes d'intoxication alimentaire, notamment une diarrhée hémorragique et quelques cas d'insuffisance rénale. Les médecins traitant les patients ont immédiatement administré l'antibiotique céfotaxime, un puissant médicament de la classe des antibiotiques bêta-lactamines. Les patients n'ont pas répondu au traitement. Les médecins soupçonnent que les E. coli étaient résistants aux bêta-lactamines cherchant déjà quel antibiotique pourrait être efficace.



### Une E.Coli trouvé dans un élevage

Des tests ultérieurs ont confirmé que l'E. coli possédait un plasmide contenant le gène SHV-2, un gène de résistance aux bêta-lactamines relativement nouveau mais en expansion. Les responsables de la santé publique ont retracé la source de l'infection jusqu'au porc contaminé provenant d'une seule ferme. L'élevage de porcs produit des quantités considérables de déchets de fumier, et les exploitations voisines craignent maintenant

que ces déchets ne propagent les gènes responsables de la résistance dans le sol et dans l'eau. Deux fermes en particulier, Apple Point Farms et Barrow Creek Farm, ont pris contact avec les responsables de la santé publique pour tenter d'évaluer leur risque éventuel. Des échantillons de sol ont été prélevés dans ces fermes afin de tester la présence du gène bêta-lactamines.

## Le gène de résistance SHV-2 a-t-il été propagé dans l'environnement ?

Les fermes Apple Point Farms et Barrow Creek Farm veulent savoir si le gène de résistance SHV-2 a contaminé leur exploitation, et donc s'il y a un risque pour leur élevage.

Pour le déterminer les responsables de la santé publique ont effectué des prélèvements de sol sur les deux exploitations.

Vous recevez de l'ADN extrait du sol de deux fermes, Apple Point et Barrow Creek, et **utilisez la PCR pour déterminer si le gène SHV-2 est présent dans l'un, les deux ou aucun des échantillons environnementaux.**

Principe de la PCR :

Vous utiliserez des amorces spécifiques au gène SHV-2 pour tester le gène de résistance. Lorsque le gène SHV-2 est présent dans un échantillon, ces amorces vont amplifier un fragment d'ADN de 700 paires de bases.

Une deuxième série d'amorces sera utilisée pour amplifier une région de 400 paires de bases du gène de l'ARN ribosomique 16S. Cette deuxième série d'amorces sera utilisée comme contrôle PCR, pour s'assurer que l'ADN était présent dans l'échantillon et que l'amplification de l'ADN dans la PCR a réussi. Vous recevrez également un échantillon d'ADN extrait d'un isolat d'E. coli connu pour contenir le gène SHV-2 (ADN positif = témoin positif) et un second échantillon d'ADN d'un isolat d'E. coli connu pour être sensible au céfotaxime (ADN négatif = témoin négatif).

### Matériel disponible

- Pour chaque binôme => six tubes :
- EZ PCR Master Mix 20 µL
- Mélange d'amorces TAPE 40 µL
- ADN d'Apple Point 10 µL
- ADN de Barrow Creek 10 µL
- ADN témoin négatif 10 µL
- ADN témoin positif 10 µL
- Micropipettes
- Embouts de micropipette jetables et un petit gobelet pour les jeter
- 4 tubes PCR (200 µL)
- Un marqueur permanent (à pointe fine)

### Protocole à suivre

#### Mise en place de la PCR :

1. Identifier 4 tubes PCR (tubes de 200 µl) par binôme (identifier les tubes sur la paroi latérale)
  - 1 tube marqué "A" : ADN de la ferme d'Apple Point
  - 1 tube marqué "B" : ADN de la ferme de Barrow Creek
  - 1 tube marqué "N" : ADN de contrôle négatif" provenant de bactéries non résistantes
  - 1 tube marqué "P" : ADN de contrôle positif" provenant de bactéries résistantes au carbapénème
2. Noté également chaque tube avec le nom du groupe sur la paroi latérale (1 prénom suffira)

3. Préparer chaque tube PCR en suivant le tableau ci-dessous :

Template DNA	Tube A	Tube B	Tube N	Tube P
	DNA From Apple Point 10 µL	DNA From Barrow Creek 10 µL	Negative Control 'non-resistant' DNA 10 µL	Positive Control 'resistant' DNA 10 µL
PARE Primer Mix	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
5X EZ PCR Master Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
<b>TOTAL VOLUME</b>	<b>25 µL</b>	<b>25 µL</b>	<b>25 µL</b>	<b>25 µL</b>

Utilisez une micropipette pour ajouter chacun des réactifs.

**N'oubliez pas de changer de cône à chaque étape !**

4. Mélangez doucement les réactifs en pipettant de haut en bas 3-4 fois, bouchez les tubes

- Assurez-vous que tout le volume de liquide s'accumule au fond du tube (si nécessaire, faites tourner brièvement les tubes à l'aide d'une microcentrifugeuse)

**AVEC LE PREPARATEUR :** Placez les tubes à l'intérieur de l'appareil PCR - Appuyez fermement sur les bouchons des tubes pour assurer un ajustement serré - Fermez le couvercle de l'appareil PCR et serrez-le doucement Programmation et surveillance de la PCR (avec le préparateur)

## Origine de la résistance de E.Coli au antibiotiques β-lactamines

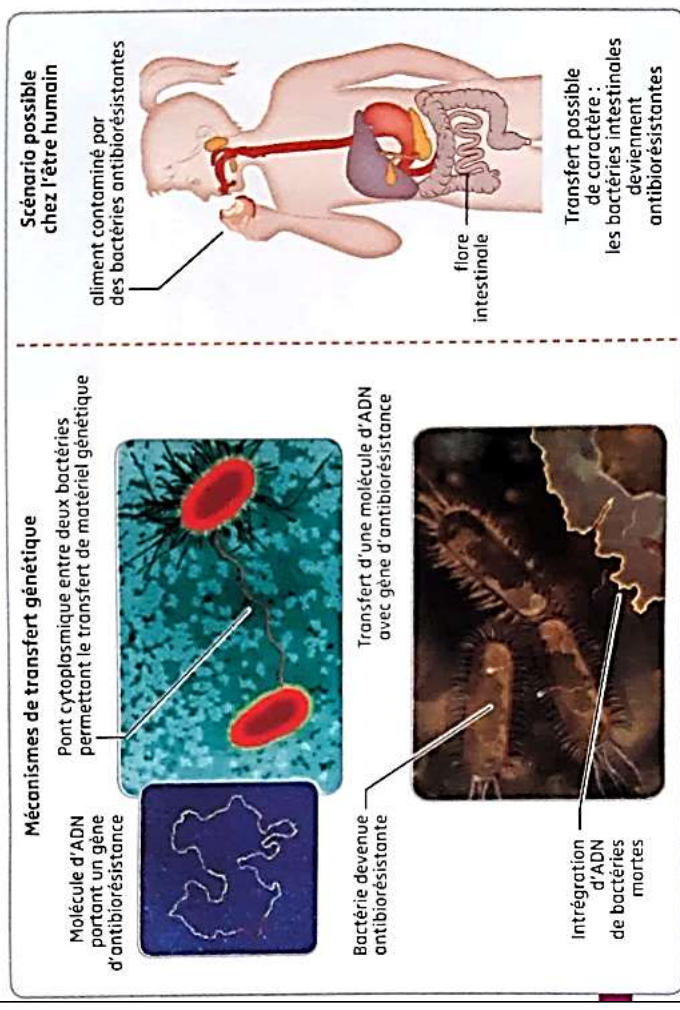
Les bactéries E.Coli responsables de l'infection sont résistantes à l'antibiotique céfotaxime qui fait partie des  $\beta$ -lactamines. Ce type d'antibiotique attaque la paroi de la bactérie. Son large spectre lui confère une forte activité sur de nombreuses bactéries. Pourtant depuis quelques temps certaines bactéries y sont devenues résistantes. Toutes les E.coli produisent de la bêta-lactamase, une enzyme responsable de la résistance naturelle à la pénicilline. Néanmoins, chez les E.coli résistantes, cette enzyme peut aussi détruire la céfotaxime (c'est pourquoi on parle de spectre étendu).

**Proposer une stratégie réalisable afin d'expliquer l'origine de la résistance de E.Coli aux antibiotiques de type  $\beta$ -lactamines et comment celle-ci est transmise pour aboutir à des populations de bactéries résistantes.**

### Ressources

**Document 1** : La bêta-lactamase est une enzyme naturellement présente chez la bactérie et qui est capable de dégrader la pénicilline. Cette enzyme est codée par le gène SHV. Chez les bactéries résistantes, cette enzyme se retrouve capable de dégrader également le céfotaxime.

### Document 2 : Echanges de gènes entre les bactéries



Matériel et recherches à mener

Logiciel Geniegen2 en ligne

A l'aide du logiciel, comparer les séquences du gène SHV-1 sensible et SHV-2 résistant au  $\beta$ -lactamines.

Dans la banque de séquence du logiciel :  
« résistance au antibiotiques chez E.Coli »

**Rendre compte de vos résultats**

**Conclure**

**Recherche d'un antibiotique efficace pour les patients touchés par l'intoxication**

Pour trouver un antibiotique efficace contre une bactérie on réalise un **antibiogramme**.

Un antibiogramme est une expérience de mise en culture de bactéries permettant de mettre en évidence et de quantifier l'action d'antibiotiques. Vous allez réaliser un antibiogramme sur une souche d'Escherichia coli testant les quatre antibiotiques suivants : Céfotaxime (C), Pénicilline (P), et Polymyxines (PM).

Matériel disponible	Protocole
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une boîte de pétri gélosée contenant un milieu nutritif gélosé et la bactérie E.coli.</li> <li>- Une pince pour tenir les pastilles d'antibiotiques.</li> <li>- Des pastilles de papier.</li> <li>- 3 tubes contenant chacun un antibiotique : Céfotaxime (C), Pénicilline (P), et Polymyxines (PM).</li> <li>- 1 feutre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tremper une pastille de papier dans un premier antibiotique.</li> <li>- Déposer la pastille imbibée sur la gélose.</li> <li>- Renouveler l'opération pour les 3 autres tubes. <b>Attention ! essayer la pince entre chaque pastille</b></li> <li>- Repérer l'emplacement de chaque pastille d'antibiotique.</li> </ul> <p><b>Attention !</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Espacer au maximum les pastilles les unes des autres et du bord.</b></li> <li>- <b>La pastille ne doit pas goutter sur la gélose...</b></li> </ul> <p>Laisser agir pendant 15 minutes avant d'observer le résultat.</p>

**Document : Interprétation d'un antibiogramme**

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle (ou phase de lyse) qui entoure la pastille d'antibiotique : **bactérie résistante, bactérie intermédiaire ou sensible.**

