

République Algérienne Démocratique et Populaire
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Badji Mokhtar-Annaba



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des Sciences
Département de Biochimie

THESE
En vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat en microbiologie

Option : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Thème

***Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants
isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba***

Présenté par : M^{elle} Meriem TOUATI

Devant le jury :

Directeur de thèse : Pr. Abdelghani DJAHOUDI

Co-directeur de thèse : Pr. Jean Marc ROLAIN

Présidente : Pr. Nafisa ABACI

Examineur : M^C_A. Houria CHETTIBI

Examineur : Pr. Brahim AIT KAKI

Examineur : Pr. Djamel Eddine BENOURETH

Université d'Annaba

Université d'Aix-Marseille

Université d'Annaba

Université d'Annaba

Université de Constantine

Université de Guelma

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2013

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement:

Monsieur le Professeur Jean Marc ROLAIN, pour m'avoir donné la chance de réaliser une grande partie de ma thèse dans son unité de recherche et pour m'avoir enseigné la rigueur scientifique et un grand merci d'avoir accepté de vous déplacé à Annaba pour participer à la soutenance en tant que mon co-directeur de thèse..

Monsieur le Professeur Abdelghani DAHOUDI, qui m'a encadré tout au long de ce travail, pour son enseignement, ses encouragements et sa compréhension.

Monsieur le Professeur Mazouz Dekhil, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire à l'hôpital DORBON, ce qui m'a aider a réalisé la première partie de mon travail, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.

Mes remerciements s'adressent également à :

Mme Nafisa ABACI, Professeur à l'Université de Annaba qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury ., je l'en remercie profondément.

Mme Houria CHETTIBI., Maitre de Conférences de Classe A à l'Université de Annaba, je la remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mr Djamel BENWARETH, Professeur à l'Université de Guelma, m'a fait l'honneur de participer à ce jury et d'examiner ce travail et un grand merci d'avoir accepté de vous déplacé à Annaba pour participer à ce jury.

Mr Brahim AIT KAKI., Professeur en microbiologie à l'Université de Constantine, qui m'a fait l'honneur d'analyser ce travail et d'en être l'un des rapporteurs, nous vous somme particulièrement reconnaissants d'avoir accepté de vous déplacé à Annaba.

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mes parents de m'avoir permis de réaliser ce travail grâce à leur financement et leur encouragement, leur disponibilité, leur patience et leurs conseils avisés et leur soutien qui m'ont été très précieux.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Abdelkarim Racherache, médecin chef du service de la réanimation, de m'avoir permis de réaliser mon travail dans votre service, un grand merci.

Merci à tout mes amis et collègues de Annaba et de l'URMIT (Seydina M. Diene, Linda Hadjadj, meryem berrazeg, Sofiane Bakour, Mustapha H) et un grand merci à HAJIRA.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Liste des abréviations	01
Liste des figures	04
Liste des tableaux	08
Introduction	09
Partie 1 : Revue Bibliographique	11
Chapitre I. Les antibiotiques	11
1. Les β -lactamines.....	11
1.1. Définition.....	11
1.2. Classification des β -lactamines.....	11
1.2.1. Pénames.....	12
1.2.2 Céphèmes	12
1.2.3 Carbapénèmes.....	13
1.2.4. Monobactames.....	14
1.3. Les β -lactamases.....	14
1.3.1. Classification des β -lactamases.....	15
1.3.1.1. Classification de Ambler.....	15
1.3.1.2. Classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros.....	15
1.3.2. Inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam).....	17
1.4. Mécanisme de résistance aux β -lactamines.....	17
1.4.1. Pénétration de β -lactamines : diminution de la perméabilité.....	17
1.4.2. Modification de la cible.....	18
1.4.3. Excrétion de l'antibiotique : efflux.....	18
1.4.4. Inactivation enzymatique de l'antibiotique : production de β -lactamases.....	18
2. Les aminosides.....	19
2.1. Définition.....	19
2.2. Classification des aminosides.....	19
2.3. Mécanisme d'action des aminosides.....	19

3. Les Fluoroquinolones.....	20
3.1. Définition.....	20
3.2. Classification des quinolones.....	20
3.3. Mécanisme d'action des quinolones.....	28
 Chapitre 2 : Bacilles à Gram négatif non fermentants et leur implications dans les infections en réanimation	21
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.1. Classification – nomenclature.....	23
1.2. Habitat.....	23
1.3. Caractères bactériologiques.....	24
1.4. Mécanisme de résistance aux β -lactamines chez <i>P. aeruginosa</i>	25
1.4.1. Résistance naturelle.....	25
1.4.2. Résistances acquises.....	26
1.4.2.1. Résistance enzymatique.....	26
1.4.2.1.1. Résistance par hyperproduction de la cephalosporinase AmpC.....	26
1.4.2.1.2. Résistance par production de β -lactamases de classe A.....	26
1.4.2.1.3. Résistance par production de β -lactamases de classe B.....	28
1.4.2.1.4. Résistance par production de β -lactamases de classe D.....	28
1.4.2.2 Résistance non enzymatique.....	29
1.4.2.2.1. Perte de la porine D2 chez <i>P. aeruginosa</i>	29
1.4.2.2.2. Surexpression du système d'efflux.....	29
1.5. Résistance aux Aminosides.....	30
1.6. Résistance aux fluoroquinolones.....	30
1.7. Facteurs de pathogénicité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.8. Epidémiologie.....	32
1.9. Infection nosocomiale à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en réanimation.....	33

2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	34
2.1. Classification – nomenclature.....	34
2.2. Habitat.....	34
2.3. Caractères bactériologiques.....	34
2.4. Mécanisme de résistance aux β -lactamines chez <i>A. baumannii</i>	35
2.4.1. Résistance naturelle.....	35
2.4.2. Résistances acquises.....	36
2.4.2.1. Mécanismes de résistance enzymatiques.....	36
2.4.2.1.1. Résistance par hyperproduction de la cephalosporinase AmpC.....	36
2.4.2.1.2. Résistance des β -lactamases à spectre étendu.....	36
2.4.2.1.3. Résistances aux carbapénèmes.....	36
2.4.2.1.3.1. Carbapénémase de classe B.....	37
2.4.2.1.3.2. Carbapénémase de classe D.....	37
2.4.2.2. Mécanismes de résistance non enzymatique.....	38
2.4.2.2.1. Diminution de la perméabilité membranaire.....	38
2.4.2.2.2. Efflux.....	39
2.4.2.2.3. Modification de PLPs.....	39
2.5. Résistance aux Aminosides	39
2.6. Résistance aux fluoroquinolones	40
2.7. Facteurs de pathogénicité de <i>A. baumannii</i>	41
2.8. Epidémiologie.....	42
2.9. Infection nosocomiale de <i>A. baumannii</i> en réanimation	42
 Partie 2 : Matériel et Méthodes	44
1. Objectifs.....	44
2. Isolement et identification des souches recherchées.....	45
2.1. Identification par système <i>API-20NE</i>	45
2.2. Identification par spectrométrie de masse MALDI (Matrix-Assisted Laser.....	45
Desorption / Ionisation) –TOF (time-of-flight mass spectrometry)	

3. AntibioGramme selon le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM)	47
4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test	48
5. Recherche phénotypique des carbapénèmases.....	48
5.1. Test d'imipénèmase par MALDI TOF ultraflex.....	48
5.2. Test de Hodge.....	50
5.3. Test de synergie EDTA-IMP : Détection des métallo-β-lactamases (MβL).....	50
6. Recherche moléculaire des β-lactamases.....	50
6.1 Recherche moléculaire des carbapénèmases.....	51
6.1.1. Polymérase Chaîne Réaction(PCR) en temps réel.....	51
6.1.2. Polymérase Chaîne Réaction(PCR) standard.....	55
6.1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	60
6.1.4. Séquençage.....	61
6.1.4.1. Analyse des séquences.....	63
6.2. Recherche moléculaire des β-lactamases à spectre étendu (BLSE).....	63
7. Recherche moléculaire de la résistance associée (aminoside, quinolone et rifampicine).....	63
8. Typage moléculaire des souches.....	64
8.1. Génotypage (<i>recA</i>).....	64
8.2. Multi-locus séquence typing (MLST).....	65
Partie 3 : Résultats et Discussion.....	66
<i>Acinetobacter baumannii</i>.....	66
1. Antibio-résistance des souches <i>Acinetobacter baumannii</i>	70
2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test®.....	72
3. Recherche phénotypique des carbapénèmases.....	73
3.1. Test MALDI TOF ultraflex.....	73
3.2. Test de Hodge.....	77
4. Détermination des supports génétiques de résistance.....	78

4.1. Détection moléculaire des gènes codant pour des carbapénèmases.....	78
4.1.1. Par PCR en temps réel.....	78
4.1.2. Par PCR en standard.....	78
4.2. Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre étendu.....	81
4.3. Recherche moléculaire de la résistance associée.....	82
5. Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés des souches.....	82
6. Recherche de la localisation génétique des gènes <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-58} et <i>bla</i> _{OXA-51} en association avec la séquence d'insertion(IS)	82
7. Génotypage recA des <i>A. baumannii</i>	86
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
1. Antibio-résistance des souches <i>P. aeruginosa</i>	92
2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test.....	94
3. Recherche phénotypique des carbapénèmases.....	95
3.1. Test MALDI TOF ultraflex.....	95
3.2. Test de synergie EDTA-IMP : Détection des métallo- β -lactamases (M β L)	97
4. Détermination des supports génétiques de résistance.....	99
4.1. Détection moléculaire des gènes codant pour des carbapénèmases.....	99
4.1.1. Par PCR en temps réel.....	99
4.1.2. Par PCR en standard.....	99
4.2. Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre étendu.....	101
4.3. Recherche moléculaire de la résistance associée.....	101
5. Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés des souches.....	102
6. Organisation génétique du gène <i>bla</i> _{VIM-2}	105
7. Multi-locus séquence typing MLST.....	107
Discussion	110
Conclusion et perspective	122
Références bibliographiques	124
Annexes	139

INTRODUCTION

Introduction

Au cours des dernières décennies, la résistance des bactéries vis-à-vis des agents anti-infectieux a été croissante, notamment en raison de l'utilisation fréquente et parfois inadéquate des antibiotiques à large spectre, particulièrement dans les services de réanimation.

Dans ces services, les bactéries responsables d'infection sont le plus souvent, le staphylocoque, les entérobactéries (*Klebsiella* et *E. coli*) et *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

Ces bactéries constituent, ainsi, un problème majeur de santé publique, d'autant plus que très peu de nouvelles molécules ont été mises sur le marché par l'industrie pharmaceutique pouvant renforcer l'arsenal thérapeutique. Ainsi, plusieurs auteurs ont tiré la sonnette d'alarme face à l'imminence de ce problème [10;15].

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont de plus en plus incriminés dans les infections nosocomiales ou autres au niveau des services de réanimation, notamment les espèces *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* qui sont considérées comme des bactéries opportunistes.

Ces deux espèces, autrefois sensibles à la quasi-totalité des antibiotiques sont aujourd'hui responsables d'infections survenant par épidémies et impliquant des souches de plus en plus multi-résistantes.

En Algérie, et dans de nombreux pays, les souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* sont parmi les espèces les plus fréquentes après *Staphylococcus aureus*, responsables d'infection nosocomiale dans les unités de soins intensifs.

A. baumannii et *P. aeruginosa* illustrent parfaitement cette capacité d'adaptation des microorganismes face à un environnement hostile, grâce à leurs résistances naturelles à de nombreux antibiotiques et antiseptiques et aussi à leurs capacités d'acquérir de nombreux mécanismes de résistance.

La compréhension des mécanismes de résistance doit permettre d'une part une surveillance épidémiologique efficace pour anticiper au mieux la progression de cette résistance.

L'émergence et la diffusion de nombreux mutants de *A. baumannii* et *P. aeruginosa* de plus en plus résistants chez les patients en cours de traitements sont autant de facteurs pouvant conduire à l'échec thérapeutique. Pour faire face à ce défi, causé par ces bactéries émergentes, les établissements de santé doivent mettre en place des stratégies de surveillance et de contrôle. Ces actions impliquent une collaboration pluridisciplinaire associant des infectiologues, des microbiologistes, des hygiénistes et des épidémiologistes.

Ces dernières années, on rapporte des taux de résistance de plus en plus élevés aux carbapénèmes qui sont des agents thérapeutiques primaires utilisés dans le traitement des infections causées par les espèces *A. baumannii* et *P. aeruginosa*. Sachant que, les déterminants génétiques de ces carbapénémases sont habituellement localisés sur des éléments génétiques mobiles incluant les plasmides ce qui facilite leur transfert vers d'autres micro-organismes.

En 2009, une nouvelle métallo- β -lactamase a été décrite à New Delhi, la métallo- β -lactamase (NDM-1) chez *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir d'un patient rapatrié de l'Inde [93]. Ce gène a été identifié par la suite chez d'autres bactéries tel que *E. coli*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*. [85;93].

Par le présent travail, nous nous sommes intéressés aux bacilles à Gram négatifs non fermentants au niveau des services de réanimation, notamment les espèces *A. baumannii* et *P. aeruginosa* souches multi-résistantes.

En utilisant divers outils de biologie moléculaire, l'ensemble de nos travaux avait pour but de rechercher les supports génétiques et le type de la résistance particulièrement la résistance aux carbapénèmes, molécules considérées comme traitement de choix des infections à *A. baumannii* et *P. aeruginosa*. Cette résistance est à ce titre, particulièrement problématique puisqu'elle diminue de façon drastique les possibilités thérapeutiques.

La première partie de ce document présentera une synthèse bibliographique sur les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques et sur les données épidémiologiques des espèces *A. baumannii* et *P. aeruginosa*. Puis, dans une seconde partie, nous détaillerons les outils méthodologiques utilisés avant d'exposer les résultats de notre travail.

PARTIE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Revue Bibliographique

Chapitre 1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles élaborés par des micro-organismes. Il existe des antibiotiques semi-synthétiques ou synthétiques. Ils sont bactériostatiques ou bactéricides à faible dose. Leurs cibles sont des structures moléculaires essentiellement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes [6].

1. Les β -lactamines

1.1. Définition

Les β -lactamines représentent la plus importante famille d'antibiotiques, aussi bien par le nombre de molécules disponibles et la diversité des molécules utilisables, que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette utilisation importante est due à leur large spectre d'action, à leur efficacité, à leur faible toxicité et à leur faible coût pour de nombreuses molécules.

L'histoire des β -lactamines débute dans les années 1930, lors des observations faite par *Sir Alexander Fleming* sur un agent antibactérien dénommé pénicilline, isolé à partir du champignon *Penicillium notatum* [64]. Il faudra attendre le début des années 1960 pour voir apparaître les premières synthèses de β -lactamines permettant leur développement à l'échelle industrielle[165]. Cependant, la grande utilisation des β -lactamines depuis plus de 60 ans s'est accompagnée d'une augmentation importante de la résistance bactérienne à ces antibiotiques. Et le développement de nouveaux antibiotiques, notamment contre les bactéries à Gram négatif, connaît un franc ralentissement depuis plus de 10 ans.

1.2. Classification des β -lactamines

La base commune à toutes les β -lactamines est le noyau β -lactame (Fig.1). À partir de ce cycle, quatre sous-familles ont été développées par adjonction de chaînes latérales : les pénicillines (ou pénames), les céphalosporines (ou céphèmes), les monobactames et les carbapénèmes [30]. (Fig. 1). Toutes ces molécules présentent des caractéristiques communes ainsi que des particularités propres à chaque classe, notamment en termes de spectre antibactérien.

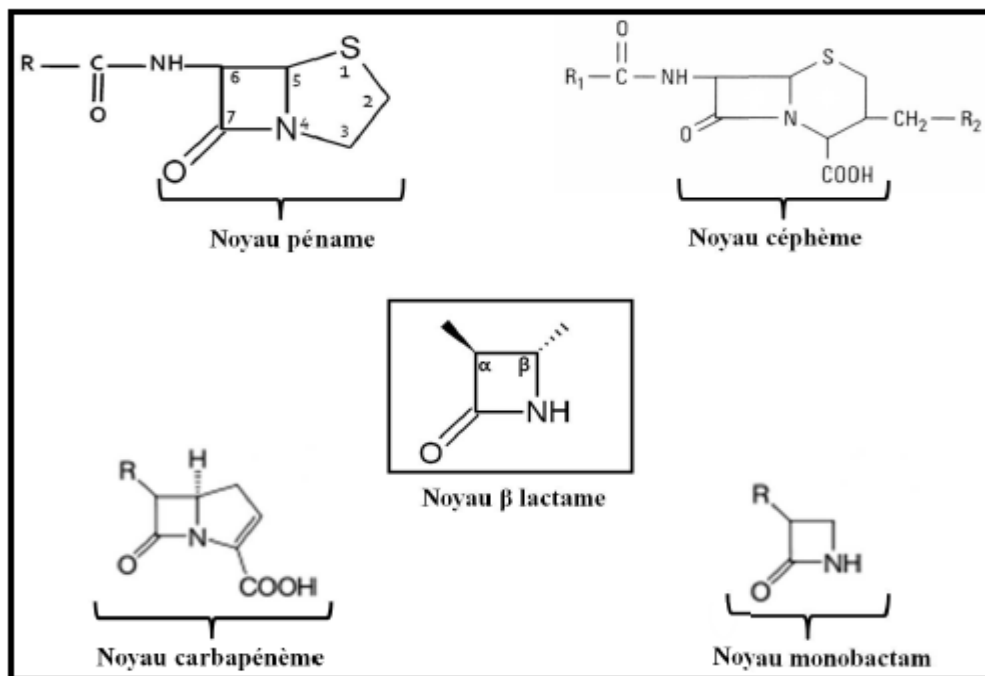


Fig. 1. Représentation des quatre principales classes de β-lactamines obtenues par substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau β-lactame (au centre)

1.2.1. Pénames

La formule générale des pénicillines associe un noyau β-lactame à un cycle thiazolidine et une chaîne latérale en C-6 (Fig. 1). Le groupe des pénicillines est constitué d'un nombre important de molécules dont les principales sont :

- Benzylpénicillines : pénicilline G
- Aminopénicillines : ampicilline, amoxicilline
- Uréidopénicillines : Pipéracilline
- Carboxypénicillines : carbénicilline, ticarcilline

1.2.2. Céphèmes

Les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (Fig. 1). On distingue quatre générations de céphalosporines. Elles sont classées en fonction de leur date d'apparition, qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés. En voici quelques exemples [30] :

- **Première génération** : Il existait plus d'une dizaine céphalosporines dites de première génération mais certaines ne sont plus commercialisées. Exp : Céfalogtine, Céfazoline.
- **Deuxième génération** : Elle est caractérisée par une meilleure résistance aux β -lactamases et un spectre d'action plus large, une activité à faible concentration, une bonne diffusion tissulaire. Exp : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine.
- **Troisième génération** : Exp : Céfotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone
- **Quatrième génération** : Elle reste active chez les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase, et inactive en cas de β -lactamase à spectre étendu. Exp : céfépime, cefpirome

Les céphalosporines de première génération ont un spectre d'action qui se limite aux cocci à Gram positif et à quelques bacilles à Gram négatif ne produisant pas de céphalosporinase. Ces molécules sont, d'autre part, aisément dégradées par les β -lactamases [30]. L'amélioration la plus importante est apportée par l'apparition des céphalosporines de troisième génération. L'addition de différents groupements chimiques a permis d'augmenter de façon considérable la stabilité de ces molécules et leur activité antibactérienne vis-à-vis des bacilles à Gram négatif. Ces molécules restent cependant hydrolysées par les céphalosporinases hyperproduites ainsi que par les β -lactamases à spectre étendu (BLSE).[30].

1.2.3. Carbapénèmes

Les Carbapénèmes sont des β -lactamines qui présentent un très large spectre d'activité et une grande stabilité vis à vis de la plupart des β -lactamases. L'imipénème et le méropénème ont été les deux premiers antibiotiques disponibles en clinique. Une troisième molécule s'est ajoutée, l'ertapénème [214]. Parmi les nouvelles Carbapénèmes, le doripénème garde une meilleure activité sur les bacilles à Gram négatif et particulièrement sur les aérobies stricts [213] .

Les Carbapénèmes sont historiquement considérées comme le traitement de choix des infections sévères à bactéries à Gram négatif [86].

1.2.4. Monobactames

À la fin des années 1970, toutes les nouvelles β -lactamines identifiées étaient produites par les *Actinomycètes*. Sykes et al. [181], entreprennent alors la recherche de nouveaux antibiotiques produits par d'autres organismes : ils découvriront les monobactames [181], qui sont des β -lactamines monocycliques inactives sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies. Ces derniers sont en revanche, très actifs sur les entérobactéries et *P. aeruginosa*. L'activité anti bactéries à Gram-négatif de l'Aztréonam, chef de file de cette classe, est globalement comparable à celle des céphalosporines de 3^{ème} génération comme la Ceftazidime. L'Aztréonam présente une bonne stabilité vis à vis des β -lactamases de spectre restreint. De plus, les monobactames constituent les seules β -lactamines non hydrolysées par les métallos- β -lactamases.

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, Azetidine, limité au cycle β -lactame. Exemple : Aztréonam.

1.3. Les β -lactamases

Les β -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux β -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif [144], hydrolysant le pont amide du cycle β -lactame pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif.

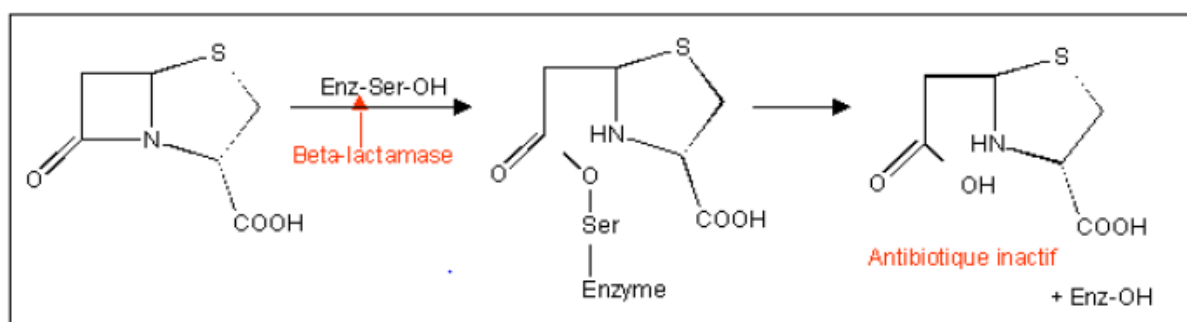


Fig.2. Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame.

Ces constantes permettent de définir le comportement enzymatique d'une β -lactamase vis-à-vis d'une β -lactamine donnée. Étendues à différentes β -lactamines, la β -lactamase permet d'établir un profil d'hydrolyse propre à chaque enzyme sur lequel s'appuie la classification de Bush [116;117].

1.3.1. Classification des β -lactamases

Actuellement deux classifications s'imposent :

1.3.1.1. Classification de Ambler

Cette classification proposée en 1980, permet de grouper les β -lactamases en quatre classes en fonction de leurs homologies structurales [5].

- **Les β -lactamases de classe A**, ou pénicillinases, constituent le groupe le plus important. Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline) et sont sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam).
- **Les β -lactamases de classe B**, ou métallo- β -lactamases, hydrolysent toutes les β -lactamines sauf l'Aztréonam. Ces β -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs des β -lactamases classiques mais sont inactivées *in vitro* par des agents chélateurs d'ions bivalents comme l'EDTA (acide éthylènediamine tétra-acétique).
- **Les β -lactamases de classe C**, ou céphalosporinases, hydrolysent préférentiellement les céphalosporines (céfalotine, ceftazidime, céfuroxime). Elles sont inhibées par la cloxacilline mais pas par les inhibiteurs de β -lactamases.
- **Les β -lactamases de classe D**, ou oxacillinases, constituent un groupe hétérogène. Elles sont caractérisées par une hydrolyse plus rapide de l'oxacilline et de la cloxacilline que de la benzylpénicilline. Les oxacillinases classiques sont inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium.

Les β -lactamases appartenant aux classes A, C et D utilisent au sein de leur site actif une sérine intervenant dans leur processus catalytique, contrairement aux β -lactamases de classe B, dépourvues de cette sérine, qui utilisent un ou deux atomes de zinc et sont appelées pour cette raison métallo- β -lactamases.

1.3.1.2. Classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros

La classification fonctionnelle réactualisée en 1995 proposée par Bush et al,[32] est basée sur le spectre préférentiel des enzymes et sur leur comportement aux inhibiteurs (Tab.1).

Tab.1. Classification des β -lactamases bactériennes (Bush et al, 1995)[32]

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group	Richmond-Sykes class	Mitsuhashi-Inoue type	Molecular class (Ambler)	Preffered substracts	Inhibited by CA EDTA	Representative enzymes
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Céphalosporins	- -	AmpC enzymes from Gram negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins Céphalosporins	+ -	Penicillinases from Gram positive Bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended spectrum cephalosporins, monobactams	+ -	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, carbenicillin	+ -	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included PCase IV	A	Penicillins,	+/- -	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase II,	A	Penicillins, carbenicillin	+ -	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	+/- -	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+ -	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, Carbapenems	+ -	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most β -lactams, including carbapenems	- +	L1 from <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA from <i>Bacteroides Fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND	Penicillins	- ?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

CSase: cephalosporinase ; PCase: penicillinase ; CXase: cefuroxime-hydrolasing β -lactamase ;

CA: clavulanic acid ; ND: not determine.

1.3.2. Inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique, Tazobactam, Sulbactam)

Les inhibiteurs des β -lactamases possèdent une activité antibiotique généralement faible. En se liant à la β -lactamase, ils permettent l'activité de la β -lactamine à laquelle ils sont associées. Il en résulte une action synergique et une augmentation de l'activité de la β -lactamine. Ce sont des substrats-suicide qui se lient de manière irréversible à la β -lactamase, empêchant l'action de celle-ci sur les β -lactamines. Ceci explique pourquoi les inhibiteurs des β -lactamases, en particulier l'acide clavulanique et le Tazobactam, ne sont généralement pas utilisés seuls, mais en association avec un antibiotique comme l'amoxicilline, la ticarcilline ou la pipéracilline. Le sulbactam possède, en plus de son effet inhibiteur irréversible sur les β -lactamases, une activité antibiotique intrinsèque sur quelques espèces bactériennes comme *A. baumannii*. Malgré leur intérêt, en pratique médicale, les inhibiteurs des β -lactamases ne permettent pas d'inactiver l'ensemble des β -lactamases produites par les bactéries [165].

1.4. Mécanisme de résistance aux β -lactamines

On distingue quatre principaux mécanismes de résistance, chacun pouvant être lié aux caractéristiques génétiques d'une espèce bactérienne donnée (résistance naturelle) ou être acquis suite à des modifications génétiques (résistance acquise) :

- ✓ Défaut de pénétration de l'antibiotique : diminution de la perméabilité
- ✓ Modification de la cible : modification des PLPs
- ✓ Excrétion de l'antibiotique : efflux
- ✓ Inactivation de l'antibiotique : production de β -lactamases.

1.4.1. Pénétration de β -lactamines : diminution de la perméabilité

Ce mécanisme est lié à la structure de la paroi bactérienne et aux propriétés physicochimiques de l'antibiotique.

Les bacilles à Gram négatif ont une paroi comprenant une membrane externe qui empêche la pénétration des antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée entraînant une résistance naturelle à ces antibiotiques, le plus souvent à bas niveau. Les molécules hydrophiles de faible masse moléculaire peuvent tout de même traverser cette barrière hydrophobe en empruntant des canaux remplis d'eau formés par des protéines transmembranaires appelées porines.

Une modification qualitative ou quantitative des porines entraîne une diminution de la perméabilité membranaire et, par conséquent, une augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques [163].

1.4.2. Modification de la cible

Ce mécanisme de résistance aux β -lactamines est prédominant chez les bactéries à Gram positif. Les cibles des β -lactamines sont les PLPs. Protéines liant les pénicillines (PLP), les β -lactamines se fixent sur les PLP à la place du dipeptide d'alanine avec lequel elles présentent une analogie structurale. Cette fixation bloque la synthèse du peptidoglycane et de ce fait la croissance bactérienne.

La bactéricide est obtenue avec l'activation du système enzymatique de la mureïne hydrolase qui provoque l'éclatement de la bactérie [74].

1.4.3. Excrétion de l'antibiotique : Efflux

Les systèmes d'efflux, basés sur une pompe insérée dans la membrane interne de la bactérie sont capables d'excréter l'antibiotique hors de celle-ci, grâce à un canal présent dans la membrane externe et à une protéine de jonction périplasmique.[118].

Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique et confère généralement des résistances de bas niveau.

Des systèmes d'efflux constitutifs ont été identifiés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif. Ces mécanismes d'efflux actifs ont été décrits à l'origine chez *E. coli* [118].

1.4.4. Inactivation enzymatique de l'antibiotique : production de β -lactamases

Ce mécanisme de résistance aux β -lactamines, prédominant chez les bactéries à Gram négatif, repose sur la production d'enzymes, capables de se lier et d'inactiver l'antibiotique. Chez les bactéries à Gram positif, les β -lactamases sont excrétées alors que chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamases restent localisées dans l'espace périplasmique.

L'origine des gènes qui code pour ces enzymes peut être intrinsèque (gène naturellement présent sur le chromosome de l'espèce bactérienne) ou extrinsèque (gène transmis à la bactérie par des plasmides ou des éléments génétiques mobiles).

2. Les aminosides

2.1. Définition

Les aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques. Leur structure de base commune comporte un aminocyclitol (cycle à 6 chaînons avec des groupements aminés), auquel se lient par des ponts glycosidiques 2 (ou exceptionnellement 3 dans la néomycine) hexoses [152].

2.2. Classification des aminosides

Ils sont divisés en trois classes [153] :

- Les déoxystreptamines bisubstituées 4-5 qui comprennent: Néomycine B ou C, Paromomycine, Lividomycine A ou B, Ribostamycine, Framycétine.
- Les déoxystreptamines bisubstituées 4-6 qui comprennent: Kanamycine A, B, C et dérivés, Amikacine, Tobramycine, Dibékacine, Gentamicine, Sisomycine, Nétilmicine.
- Les autres : Streptomycine, Streptidine, Spectinomycine.

2.3. Mécanisme d'action des aminosides

Les aminosides agissent au niveau du ribosome bactérien et perturbent la synthèse protéique [59]

La pénétration des aminosides à l'intérieur de la bactérie se fait en 3 étapes :

- ❖ La première étape est un passage passif qui permet la traversée de la membrane externe (pour les Gram -) via les porines, puis la traversée du peptidoglycane (Gram + et -). Les aminosides se concentrent alors au niveau de la membrane cytoplasmique [36].
- ❖ La deuxième étape requiert une énergie métabolique délivrée par un gradient entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et cette étape peut être bloquée par mutation. Elle peut également être perturbée, si les conditions strictes exigées par la production d'énergie oxydative pour le transport des aminosides ne sont pas respectées. Ceci explique la sensibilité réduite des anaérobies aux aminosides, et la diminution d'activité des aminosides sur les anaérobies facultatifs (entérobactérie) en cas d'infection en anaérobiose relative [31].

- ❖ La troisième étape est la plus rapide, les aminosides se fixent sur le ribosome et provoquent la fixation d'un ARNt incorrect sur l'ARNm, ce qui perturbe la reconnaissance codon-anticodon et induit la synthèse de protéines erronées.

Un effet supplémentaire induit par l'incorporation de protéines anormales est l'altération de la membrane cytoplasmique. Cela se traduit par une action bactéricide rapide et puissante.

3. Les Fluoroquinolones

3.1. Définition

Les quinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique, qui dérivent d'acides carboxyliques hétérocycliques diversement substitués. Toutes les quinolones actuelles présentent une structure bicyclique, avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones, ainsi appelées car contenant un atome de fluor en position 6, dérivent de la quinoléine [187].

3.2. Classification des quinolones

- ❑ de première génération (acide nalidixique).
- ❑ de deuxième génération (Ofloxacin, Ciprofloxacin, Lévofloxacin, ...).
- ❑ de troisième génération (Trovafoxacin, Gémifloxacin, Moxifloxacin).
- ❑ de quatrième génération : des fluoroquinolones (Garénoxacin).

3.3. Mécanisme d'action des quinolones

Le mécanisme d'action de cette classe pharmacologique consiste en une inhibition de l'ADN gyrase, topoisomérase II bactérienne composée de deux sous-unités A et deux sous-unités B et de la topoisomérase IV. Ces enzymes sont essentielles à la réplication et à la transcription de l'ADN bactérien; l'inhibition par les quinolones du complexe ADN bactérien /enzymes empêche le «surenroulement» de l'ADN, le relâchement de l'ADN «surenroulé» et entraîne la séparation de la double chaîne hélicoïdale de l'ADN. Les quinolones sont spécifiques à l'ADN bactérien et exercent une activité bactéricide pendant la phase de multiplication et de repos des bactéries [97].

Chapitre 2 : Bacilles à Gram négatif non fermentants et leur implication dans les infections au service de réanimation

La position taxonomique des bacilles à Gram négatif non fermentants a subi de nombreux changements ces dernières années, depuis la publication de la liste : « Approved list of bacterial names » [162]. Ces changements reposent sur des données phénotypiques comme les caractères conventionnels ou nutritionnels mais surtout génomiques (teneur en bases de l'ADN, pourcentage d'hybridation ADN-ADN, détermination de la stabilité thermique des hybrides). On peut distinguer un certain nombre de genres [*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Chryseomonas*, *Flavobacterium*, *Flavimonas*, *Frateuria*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Bordetella*, *Kingella*, *Oligella*, *Protomonas*, *Xanthomonas*].

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGN-NF) sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux, air...) et pouvant être responsables d'infections cliniques. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées au cours d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales.

Au sein des BGN-NF, les souches *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter baumannii* sont les bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs [17].

Ce sont des bactéries à Gram négatif aérobies stricts de culture « facile » formant un groupe de bactéries très souvent oxydase positive (Fig. 3).

Ces bactéries, cultivées sur milieux ordinaires, possèdent un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons). A noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose.

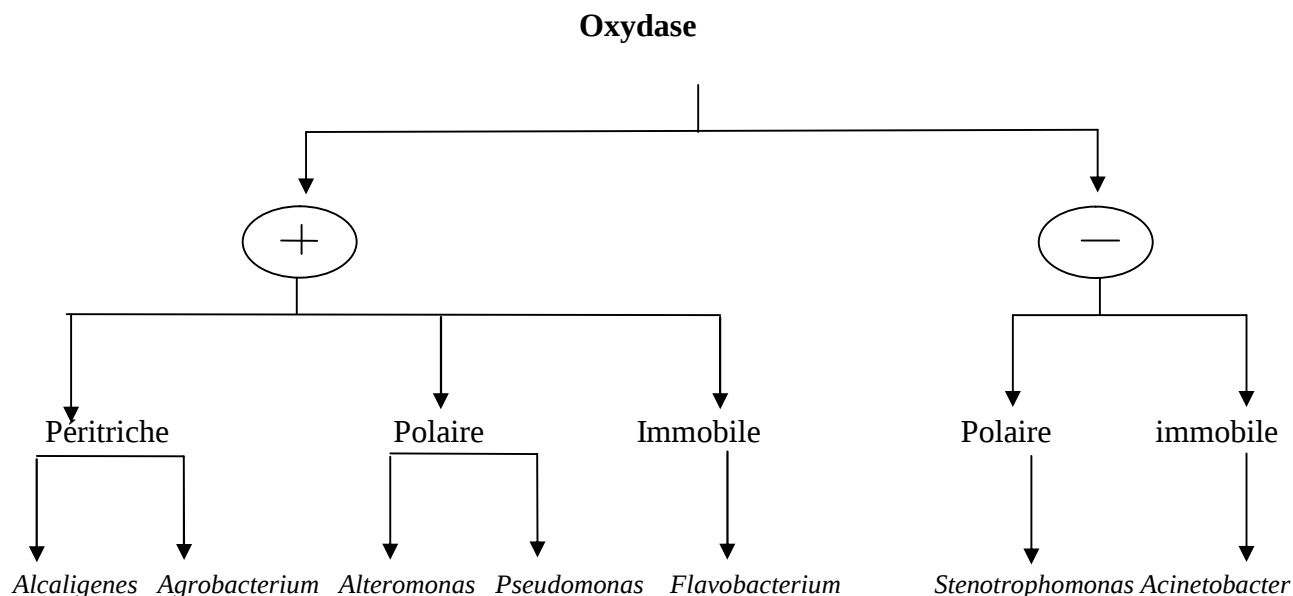


Fig. 3. Algorithme des principaux genres des BGN-NF

Ces bactéries représentent la majorité des pathogènes responsables d'infection nosocomiale au service de réanimation. Parmi ces bactéries BGN-NF, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont les plus incriminées, car se sont des colonisateurs de l'environnement de ces services. Elles peuvent survivre plusieurs mois sur des surfaces inertes et même humides surtout les espèces du genre *Pseudomonas*.

La transmission est en générale manuportée surtout par le personnel soignant. Mais peut être par contact direct par les instruments ou encore par inhalation. [2;60;68;76].

Les pneumopathies nosocomiales, représentent l'une des principales causes d'infection en réanimation suivie par les infections urinaires. Son incidence est particulièrement élevée dans les unités des soins intensifs (USI) par rapport aux autres services hospitaliers. Les pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique (PNAVM) en représentent la forme la plus fréquente et la plus sévère malgré les progrès de l'antibiothérapie et la mise en œuvre de mesures de prévention [60;69]. Après les infections à pneumopathies et les infections urinaires viennent les infections à cathéters et les bactériémies.

1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.2. Classification - nomenclature

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est du règne *Bacteria*, de la division *Proteobacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordre *Pseudomonadales*, Famille *Pseudomonadaceae*, et du Genre *Pseudomonas* [29].

Ce sont des bacilles à Gram négatif, asporulés, très mobiles grâce à un cil polaire. La membrane externe contient des porines dont le nombre et la taille, susceptibles de varier, conditionnent la perméabilité aux antibiotiques. La structure du LPS (lipopolysaccharide) de cette membrane est également très hétérogène. Il est autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique (bacille du "pus bleu") est de loin, l'espèce la plus fréquemment isolée en bactériologie médicale. Commensal du tube digestif mais peu abondant chez le sujet sain, il occasionne de nombreuses infections chez les sujets fragilisés. Il est à l'origine de 10% des infections nosocomiales. Ils se comportent comme des pathogènes opportunistes [29].

1.2. Habitat

Selon Palleroni, N., [137] *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce bactérienne dont l'habitat est le plus vaste. Elle vit à l'état saprophyte dans l'eau et les sols humides (elle résiste mal à la dessiccation) ou à la surface des végétaux. Elle vit également à l'état commensal dans l'intestin de l'homme et des animaux. Elle est isolée rarement, de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. De nombreuses souches pouvant se développer à basse température (souches psychrophiles) contaminent les denrées alimentaires ou produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur. Elle peut aussi contaminer le matériel hospitalier, hôtelier (robinetterie), médical (sondes, trocars, cathéters) ou chirurgical (instruments, matériels de prothèse), les solutions antiseptiques, les solutés injectables, des produits médicamenteux ou cosmétiques.

1.3. Caractères bactériologiques

Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 μm de diamètre sur 1,5 à 3,0 μm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires), produisant le plus souvent de la pyoverdine et de la pyocyanine (les souches ne produisant aucun de ces pigments sont très peu nombreuses), pouvant également excréter de la pyomélanine (pigment brun noir) et de la pyorubrine (pigment rouge), nitrate réductase positive et respirant les nitrates, catalase et oxydase positives, ADH positive, citrate de Simmons positive, hydrolysant la gélatine (gélatinase très active), donnant une réponse négative aux tests LDC, ODC, TDA, indole, β -galactosidase (mais quelques souches hydrolysent l'ONPG au moyen d'une enzyme différente de la β -galactosidase), uréase, production d'hydrogène sulfuré, hydrolyse de l'amidon, hydrolyse de l'esculine et lécithinase.

Pseudomonas aeruginosa assimile de nombreux composés carbonés (acétamide, acétate, D-alanine, L-arginine, butyrate, géraniol, glucose, lactate, malonate, mannitol, propionate), mais elle n'utilise ni l'adonitol ni l'inositol ni le maltose ni le mucate ni le saccharose ni le sorbitol ni le tréhalose.

La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C, mais il peut pousser à 42 °C, mais aucune culture n'est obtenue à 4 °C ou à 46 °C.

Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sont de trois types :

- Les colonies larges sont grandes, rugueuses avec un centre plus bombé (colonies en œufs sur le plat) et un bord irrégulier. Très souvent, les colonies la présentent sous forme de petits phages d'autolyse donnant un reflet irisé ou métallique caractéristique.
- Les colonies *sm* (small) sont rondes, petites, convexes et lisses.
- Les colonies muqueuses sont bombées, opaques visqueuses, filantes, ou parfois coulantes. Elles possèdent une pseudo-capsule constituée d'alginate.

Pseudomonas aeruginosa possède de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction et la plupart des souches (probablement 100% des souches) sont lysogènes et souvent polylysogènes (une même souche peut héberger 8 à 10 phages

tempérés sur son chromosome ou sur un plasmide). Cette haute fréquence de lysogénie n'est pas retrouvée pour les autres espèces du genre *Pseudomonas*.

La présence de plasmides et de phages tempérés explique les nombreuses variations génétiques observées dans cette espèce. Elle explique, au moins partiellement, la fréquence des souches polymédicamenteuses aux antibiotiques.

L'étude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa* a rendu nécessaire le développement de méthodes de typage.

L'étude des antigènes O a été initiée par Habs H., [70]. Cette bactériologiste a construit un schéma de typage en 12 groupes sérologiques (schéma IATS, International Antigenic Typing System) qui a été maintenant étendu à 20 groupes. Le typage est réalisé à l'aide d'une technique d'agglutination sur lame utilisant une culture de 16 à 18 heures. En pratique courante, on ne dispose que de 16 antisérums spécifiques (O:1 à O:16) qui sont également commercialisés sous forme de mélanges contenant chacun quatre antisérums. En France, les sérovars O:1, O:3, O:6 et O:11 sont les plus fréquemment isolés en bactériologie médicale. Les septicémies sont souvent dues aux sérovars 1, 2, 5, 6, 8, 10 et 11. Les souches du sérovar O:12 sont généralement très résistantes aux antibiotiques et elles sont souvent isolées dans les services de réanimation et d'hématologie clinique.

1.4. Mécanisme de résistance aux β -lactamines chez de *P. aeruginosa*

1.4.1. Résistance naturelle

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C. Cette enzyme n'est pas inhibée par le clavulanate. Cette résistance naturelle est due aussi à une mauvaise perméabilité membranaire. Il est donc naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération et aux quinolones de première génération. *P. aeruginosa* est aussi généralement résistant à la kanamycine [152]. A ces différents mécanismes, s'ajoute le système d'efflux actif Mex AB-OprM, produit constitutivement chez les bactéries sauvages. Ce système joue un rôle fondamental dans la résistance naturelle à de nombreux agents toxiques ou antibiotiques dont les β -lactamines [105] et les aminosides [115] .

P. aeruginosa a toujours été considéré comme un micro-organisme difficile à traiter en raison de sa résistance aux antibiotiques. Il n'est sensible naturellement qu'à un nombre restreint d'antibiotiques.

1.4.2. Résistances acquises

1.4.2.1. Résistance enzymatique

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type serine (classes A, C et D) ou métallo-enzymes (classe B) dont les substrats sont des β -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle β -lactame [144].

1.4.2.1.1. Résistance par hyperproduction de la céphalosporinase AmpC

Les céphalosporinases appartiennent à la classe C de la classification d'Ambler, ce sont des sérine-enzymes. Le mécanisme le plus fréquent est une hyperproduction constitutive de l'AmpC. La surproduction constitutive de l'enzyme AmpC affecte principalement l'activité de la ticarcilline, de l'association pipéracilline/tazobactam, de la Ceftazidime, de l'Aztréonam et dans une moindre mesure du Céfépime.

Habituellement, l'enzyme est produite en petites quantités. Toutefois, la production d'AmpC chez *P. aeruginosa* peut augmenter de 10 à 1000 fois [8]. L'hyperproduction de céphalosporinase de type AmpC permet *P. aeruginosa* de résister à toutes les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. Son action échappe à l'action des inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique ou tazobactam. La nouveauté de la résistance c'est la relation avec la quantité d'enzyme AmpC produite [105]. La cinétique d'hydrolyse n'est pas le reflet direct de l'activité enzymatique. En effet, l'efficacité de AmpC dépend, à la fois, de la perméabilité de la membrane externe et de l'efflux des molécules d'antibiotiques [32].

1.4.2.1.2. Résistance par production de β -lactamases de classe A

✓ Pénicillinases

On distingue dans la classe A, les pénicillinases et les β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les pénicillinases décrites : PSE-1 (enzyme spécifique de *Pseudomonas*) encore dénommée CARB-2, PSE-4 (CARB-1), PSE-3 à 5, CARB-2 et CARB-4 [14].

Toutefois, PSE-1 est la pénicillinase majoritaire (90% des cas). Ces enzymes sont étroitement liées, la seule différence est 1 ou 2 acides aminés [32;172].

Ces pénicillinases hydrolysent les Carboxypénicillines, les Uréidopénicillines et la cefsulodine, et sont inactives sur la Ceftazidime et les carbapénèmes.

✓ Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes récemment apparues à la suite des mutations des pénicillinases. Elles sont plasmidiques donc transférables et sensibles à l'action des inhibiteurs enzymatiques. Elles sont très actives sur les pénicillines et moyennement actives sur les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (Ceftazidime et Cefotaxime) et les monobactames (Aztréonam). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les Cephamicines (Céfoxitine) ni les Carbapénèmes [200] .

Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P. aeruginosa*. Entre 1992 et 1998, plusieurs souches de *P. aeruginosa* productrices de TEM ont été isolées en France : TEM-42 [124], TEM-4 [146], TEM-21[56] et TEM-24 [113]. Ces BLSE ont un spectre d'activité équivalent à celui des TEM isolées chez les entérobactéries (C3G et Aztréonam).

SHV-2a a été détecté en France en 1995 [128]. Et plus tard en Thaïlande, en Pologne [35] et en Tunisie [71]. Le gène PER-1 a été identifié sur un chromosome de *P. aeruginosa* isolé d'un tractus urinaire d'un patient Turque hospitalisé à Paris en 1992 [132].

Il existe actuellement neuf types de BLSE connus. Jusqu'à présent, quatre types de GES (GES-1, -2, -8 et -9) ont été trouvés chez *P. aeruginosa* [204]. Les résistances acquises aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) se distinguent, soit par hyperproduction de céphalosporines, soit par BLSE car les phénotypes de résistance sont différents. Ces enzymes sont habituellement détectées par une synergie entre une C3G (notamment la Ceftazidime) ou l'Aztréonam et l'acide clavulanique (aspect en « bouchon de champagne » sur un antibiogramme).

La diffusion des gènes de la classe A des BLSE joue un rôle important dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques, et peut limiter ainsi les possibilités de traitement des infections causées par *P. aeruginosa*.

1.4.2.1.3. Résistance par production de β -lactamases de classe B

Les enzymes de ce groupe sont également connues sous le nom de carbapénémase ou métallo-de β -lactamase (MBL) en raison de la présence d'un ou deux atomes de Zn^{2+} dans leur actif pour hydrolyser des β -lactamines [131]. Seul le monobactam est épargné par les caractéristiques hydrolytiques des MBL. L'activité enzymatique des carbapénémases n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA, qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif [133].

L'isolement des MBL transférables est en revanche, de plus en plus fréquent. Il existe de nombreuses variétés de MBL regroupées dans plusieurs familles : VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM [201;210].

IMP-1 a été isolé pour la première fois au Japon en 1990 sur un plasmide conjugatif dans une souche de *P. aeruginosa* [158;201].

VIM-1 a été isolé pour la première fois en 1997 en Italie à Vérone dans une souche de *P. aeruginosa* [99].

La famille VIM est actuellement constituée de 27 membres (<http://www.lahey.org/Studies/>). Ces MBL sont principalement retrouvées chez *P. aeruginosa*, mais ont également été décrites chez de nombreuses entérobactéries, en particulier *K. pneumoniae* [202].

En France, VIM-2 a été isolé pour la première fois en 1996 chez *P. aeruginosa* à Marseille [149]. L'enzyme VIM-2 est la MBL la plus fréquemment isolée dans le monde chez *P. aeruginosa* [43].

1.4.2.1.4. Résistance par production de β -lactamases de classe D

Les oxacillinasés sont des pénicillinasés dont le spectre s'est étendu dans certains cas aux C3G et dans d'autres aux carbapénèmes.

Chez *P. aeruginosa*, les BLSE dérivées d'OXA-10 et OXA-2 ont été isolées (OXA-10, 11, 14, 15,16, 19) ainsi que la β -lactamase OXA-18. Ces enzymes sont localisées sur des plasmides (sauf OXA-18). Ils hydrolysent la plupart des β -lactamines, y compris les

céphalosporines, l'imipénème et le Méropénème. L'Aztréonam et la pipéracilline sont moins touchés, mais leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam [141]. L'OXA-18 est la seule β -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifié chez *P. aeruginosa*. *bla*_{OXA-18} est localisé au niveau de chromosome [128].

Les carbapénèmes de type OXA présentent une grande diversité de séquences protéiques, mais ont un spectre d'activité assez proche. En l'absence d'autres mécanismes de résistance (autres β -lactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porines, ou pompes à efflux), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes [203].

1.4.2.2. Résistance non enzymatique

1.4.2.2.1. Perte de la porine D2 chez *P. aeruginosa*

Le principal mécanisme par lequel *P. aeruginosa* acquiert une résistance aux carbapénèmes est la réduction de la perméabilité par perte de la porine OprD, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes. Ce mécanisme de résistance est stable depuis plusieurs années et est présent en France chez 15 à 20 % des souches. Cette perte de porine est en effet responsable d'une augmentation de la CMI, rendant la souche intermédiaire ou résistante aux carbapénèmes. Lorsqu'elle s'accompagne de l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC, ou de l'hyper-expression du mécanisme d'efflux mexAB-oprM, les CMI peuvent être encore plus élevées [107;157].

La fréquence de mutation du gène de la porine OprD est de $[10^{-7}$ à $10^{-8}]$ et les CMI des carbapénèmes sont multipliées par un facteur de 8 à 32. Selon le niveau atteint des CMI, les souches sont rendues I/R pour l'imipénème et S/I/R pour le Méropénème et le Doripénème. La résistance est généralement croisée entre les molécules, mais il convient de le vérifier cas par cas car des souches résistantes à une molécule peuvent s'avérer sensibles à une autre, en fonction des mécanismes de résistances en cause [106;130;136] .

1.4.2.2.2. Surexpression de système d'efflux

Le système MexAB-OprM, cause une résistance naturelle à la plupart des β -lactamines; par dépression génétique. Il occasionne une résistance acquise à ces molécules. Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN ne se manifestent pas normalement, mais, suite à

des mutations, peuvent être responsables de résistances acquises multiples, dont le spectre est légèrement différent [140].

1.5. Résistance aux Aminosides

Les aminosides sont des agents antibactériens, naturels, produits par les *Actinomycetales* des genres *Streptomyces* et *Micronospora*. L'action des aminosides repose principalement sur la capacité à inhiber la synthèse protéique en bloquant l'action ribosomale aux différents stades de la traduction, ou encore en introduisant des erreurs dans la synthèse peptidique [211].

Le mécanisme majeur de la résistance aux aminosides repose sur la modification enzymatique de certains groupements chimiques de ces antibiotiques. Trois classes d'enzymes ont été décrits chez *P. aeruginosa* : les N-amino-acétyltransférases (AAC) qui catalysent l'acétylation des fonctions $-NH_2$, les O-phosphotransférases (APH) et les O-nucléotidyltransférase (ANT) qui permettent respectivement la phosphorylation et la nucléotidylation des fonctions-OH (57). La modification des AAC participe à la résistance de cette espèce à la plupart des aminosides utilisés en thérapeutique (gentamicine, Tobramycine, Nétilmicine et Amikacine) [89].

Pour les APH le niveau de résistance du bacille pyocyanique augmente pour la kanamycine et la néomycine. Enfin, les ANT confèrent une résistance à la streptomycine, la Spectinomycine, la gentamicine et la Tobramycine [108;122].

1.6. Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques de synthèse à pouvoir bactéricide rapide comme la ciprofloxacine. Ces antibiotiques ont pour cible les topoisomérases bactériennes de types II (l'ADN gyrase et la topoisomérases IV). Chacune de ces enzymes est formée de 2 sous-unités, *GyrA* et *GyrB*, *parC* et *ParE*, respectivement.

La résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est due à la présence de mutation dans les Quinolone Resistance Detemining Regions (QRDR), des gènes codant les cibles et à la surexpression du système d'efflux [211].

Les mutations dans les QRDR des gènes *gyrA* et *gyrB*, *parC* et *ParE* affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles [78;211]. Chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, l'altération des QRDR des sous unités *gyrB* et *parC* est peu fréquente. Elle conduit à une résistance modérée aux fluoroquinolones [78]. Par contre, les mutations dans le gène *gyrA* sont plus fréquentes et sont responsables d'une augmentation plus forte des CMI de la ciprofloxacine (CMI de 1 à 64 mg/L)[1].

1.7. Facteurs de pathogénicité *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa possède un grand nombre de facteurs de virulence jouant un rôle dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus. Il possède des pili de type IV permettant l'adhésion aux épithéliums. L'exoenzyme S ainsi que d'autres adhésines non piliées renforcent l'adhésion. L'exoenzyme S, localisée sur la membrane externe est capable de se fixer fortement aux glycosphingolipides, joue un rôle important.

Le flagelle semble également intervenir dans l'adhésion et les souches non flagellées ont une virulence atténuée.

Pseudomonas aeruginosa produit des sidérophores, notamment la pyoverdine et la pyochéline, qui permettent à la bactérie de se multiplier en l'absence de fer libre.

Les souches isolées de l'appareil respiratoire, notamment de patients souffrant de mucoviscidose possèdent une pseudocapsule d'alginate qui protège le germe de la phagocytose, de la déshydratation et des antibiotiques. De plus, elle améliore l'adhérence aux cellules épithéliales en formant un biofilm.

La cytotoxine est une protéine située dans l'espace périplasmique qui est libérée après la phase de croissance exponentielle. Elle est responsable de la formation de pores dans les membranes cellulaires, notamment dans la membrane des leucocytes, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité et une libération d'enzymes lysosomiales. Elle est ainsi responsable d'une inflammation sévère et d'une nécrose tissulaire.

La phospholipase C est une hémolysine thermolabile dont la synthèse est induite par une carence en phosphate. Elle libère des phosphorylcholines à partir de la phosphatidylcholine ou de la sphingomyéline. Son substrat principal est le constituant majeur du surfactant pulmonaire.

Pseudomonas aeruginosa produit au moins quatre protéases qui provoquent des hémorragies et des nécroses tissulaires. La plus importante est une élastase qui agit sur l'élastine (composant structural majeur des tissus pulmonaires), la laminine, les collagènes de type III et IV et sur les protéoglycanes. Une protéase alcaline joue un rôle important dans la dégradation directe des protéines du tissu cornéen, mais aussi un rôle indirect en activant des protéases endogènes de la cornée. La protéase alcaline dégrade également l'interféron gamma et les protéines du système complémentaire.

L'exotoxine A agit d'une manière comparable à la toxine diphtérique. Elle inhibe la synthèse protéique des cellules eucaryotes par ADP-ribosylation du facteur d'élongation EF2. Sa synthèse est stimulée par la carence en fer.

L'exoenzyme S possède également une activité ADP-ribosyl transférase. Elle agit sur la vimentine (un composant du cytosquelette), les immunoglobulines A et G et elle entraîne une dépolymérisation des filaments d'actine et contribue à la résistance aux macrophages.

1.8. Epidémiologie

Pseudomonas aeruginosa est un micro-organisme très répandu et capable de persister dans l'environnement. Il a la capacité d'utiliser différents composés organiques comme source d'énergie et la capacité de survivre pendant de longues périodes, dans l'humidité.

Le réservoir naturel de ce microorganisme hydrophile est représenté par les sols humides, les végétaux, et surtout les eaux douces, usées et marines [166].

Le bacille pyocyanique est indépendant de l'homme mais peut être commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures. Pour les sujets en bonne santé *P. aeruginosa* est peu présent, avec seulement 2 à 10% de porteurs, tandis que chez les sujets hospitalisés, ce taux peut atteindre 50% voire 60% sur les plaies de brûlure ou d'escarres. Le milieu hospitalier peut être un habitat idéal pour ce micro-organisme. En effet, de nombreuses niches écologiques existent dans les hôpitaux, en particulier au niveau des points d'eau et des milieux humides, notamment au niveau des robinets et des siphons [22;193].

Le rôle de l'environnement dans la colonisation par *P. aeruginosa* des patients est une question clé. De nombreuses études attribuent un rôle majeur aux points d'eau sur l'incidence de la colonisation des patients dans les unités de soins intensifs [98;192;193].

P. aeruginosa peut contaminer le matériel hospitalier, tel que les endoscopes [178;179], les nébulisateurs [39], les équipements de dialyse [206;208], des analyseurs de gaz du sang [67]. Ainsi de nombreuses épidémies hospitalières ont été imputées à la contamination de divers instruments transmises directement à partir du réservoir aux patients sans passer par aucun intermédiaire.

1.9. Infection nosocomiale à *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation

Le taux d'incidence des infections nosocomiales liées à *P. aeruginosa* est plus important dans les unités de soins intensifs que dans les autres services. À l'admission, environ 1% [20] des patients sont infectés par le bacille pyocyanique et ce taux tend à augmenter au cours de l'hospitalisation, pour atteindre entre 3% à 10% [11;16].

Les principales infections causées par *P. aeruginosa* en termes de fréquence, de morbidité et de mortalité sont les pneumopathies sous ventilation assistée [16;26;188]. Les patients sont souvent colonisés par *P. aeruginosa* avant de développer une infection.

Ainsi, les dépistages effectués chez les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs montrent que le taux de colonisation à l'admission varie entre 2 à 13 % des individus. Mais ce taux augmente au cours de la période d'hospitalisation entre 15 à 44%. Pour les patients qui ne sont ni colonisés, ni infectés lors de l'admission, ils risquent de contracter *P. aeruginosa* qui est en corrélation avec l'utilisation des cathéters urinaires [23]. La durée du séjour au niveau des structures de soins intensifs [21;184], le traitement antibiotique [7;160] les néoplasies [23].

2. *Acinetobacter baumannii*

2.1. Classification - nomenclature

Bergey's manual de bactériologie systématique [29]., a classé le genre *Acinetobacter* dans la famille de *Neisseriaceae* mais cette disposition a jamais été formellement approuvée par les taxonomistes. Après cela, les développements taxonomiques ont aboutis à la proposition que les membres du genre doivent être classés dans la nouvelle famille *Moraxellaceae*. Il y'a en fait 32 espèces génomiques, dont 17 avec un nom validé. Seulement 10 espèces ont été isolées dans des échantillons humains (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri* et *A. ursingii*), et 7 espèces nouvellement décrites ont été isolées de boues activées (*A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. gernerii*, *A. grimontii*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae* et *A. townneri*) [54].

2.2. Habitat

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquistes (eau, sol, végétaux). Chez l'homme, les *Acinetobacter* font partie de la flore cutanée de la peau saine, et sont souvent retrouvés dans les localisations humides (creux axillaires, aines, espaces interdigitaux). Les *Acinetobacter* sont principalement responsables d'infections nosocomiales (environ 10% des infections nosocomiales), septicémies, méningites, suppurations diverses, infections urinaires, pneumopathie) Leur grande résistance aux antibiotiques rend le traitement de ces infections difficile. *Acinetobacter baumannii* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans ce type d'infection[114].

2.3. Caractères bactériologiques

- Morphologie Coloration : Bacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés, parfois capsulés, trapus, souvent associés en paire ou en courtes chaînes ; formes filamenteuses dans les cultures âgées.

- Caractères culturels : Aérobie strict, cultive facilement sur milieux usuels. *Acinetobacter baumannii* est la seule espèce cultiver à 44°C.

- Caractères d'identification : Le diagnostic du genre est aisé : bacilles à gram-, aérobies stricts, oxydase-, catalase + L'identification biochimique des diverses espèces est difficile, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, et *Acinetobacter genomospecies* 3 et 13 sont très difficiles à distinguer par leurs caractères phénotypiques. Le diagnostic différentiel entre ces 4 taxons repose sur des tests d'assimilation [114].

2.4. Mécanismes de résistance aux β -lactamines chez *A. baumannii*

2.4.1. Résistance naturelle

Les souches de *A. baumannii* sont naturellement résistantes à la pénicilline G, à l'amoxicilline et aux céphalosporines de première et deuxième générations.

Les souches sauvages de *A. baumannii* produisent une β -lactamase de type céphalosporinase (ou AmpC), désignée également « *Acinetobacter-derived cephalosporinases* » (ADCs). La présence de ces enzymes ADCs représente le mécanisme de résistance aux β -lactamines le plus fréquent chez *A. baumannii*. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les aminopénicillines et les céphalosporines de première et de deuxième génération [27]. Contrairement aux enzymes AmpC identifiées chez les autres organismes à Gram négatif, l'expression du gène *blaampC* n'est pas inductible. Ceci est dû au fait qu'aucun gène régulateur n'est présent en amont du gène *blaampC*, contrairement à ce que l'on observe par exemple pour *P. aeruginosa*.

A. baumannii possède aussi naturellement sur son chromosome un gène codant pour une oxacillinase (ou β -lactamase de classe D) dont le représentant principal est OXA-51, avec de très nombreux variantes décrits comme OXA-69, OXA-66 par exemple. Le rôle des gènes de type *bla*_{OXA-51} dans la résistance naturelle de *A. baumannii* semble très faible [75]. La résistance naturelle de *A. baumannii* à certaines β -lactamines résulte de l'association de plusieurs mécanismes incluant une taille réduite des protéines de membrane externe et une production limitée de porines.

2.4.2. Résistances acquises

2.4.2.1. Résistance enzymatiques

2.4.2.1.1. Résistance des céphalosporinase Amp C

Différents mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été signalés et identifiés chez *Acinetobacter baumannii* [42] liés principalement à la production de β -lactamases. *A. baumannii* produit naturellement une céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimé à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (Céfalotine) ou des Carbapénèmes. L'insertion d'une séquence spécifique ISAba1 en amont du gène blaAmpC favorise l'expression de cette β -lactamase de type AmpC en fournissant des séquences promoteur ce qui entraîne la résistance à la Ceftazidime [151].

2.4.2.1.2. Résistance des β -actamases à spectre étendu

Chez *A. baumannii* les BLSE sont soit chromosomiques ou plasmidiques [176] ; Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *A. baumannii*, Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la Ceftazidime et l'Aztréonam. Les gènes correspondant à ces BLSE sont le plus souvent retrouvés dans des structures de type intégron comme gènes cassettes (VEB-1, IBC-1, GES-1, GES-3) et donc sous la dépendance de promoteurs situés à l'extrémité 3' du gène de l'intégrase [144].

Les BLSE de type GES ont aussi été décrites chez *A. baumannii*, certains variants comme GES-11 et surtout GES-14 pouvant conférer une résistance à toutes les β -lactamines, incluant les carbapénèmes [25;123]. Plus récemment, la BLSE la plus répandue dans le monde, CTX-M-15, a été identifiée chez *A. baumannii* [154;175].

2.4.2.1.3. Résistances aux carbapénèmes

La résistance aux carbapénèmes est problématique chez *A. baumannii* puisque ces molécules sont considérées comme le traitement de choix des infections impliquant ce germe. Lorsque ce germe est résistant aux carbapénèmes, les possibilités thérapeutiques deviennent très limitées. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii*.

2.4.2.1.3.1. Carbapénèmases de classe B

Les β -lactamases de classe B « Appelée métallob-lactamases (MBLs) » ont besoin d'un atome de zinc pour détruire les β -lactamines, elles sont inhibées par l'EDTA [41].

Les déterminants MBLs les plus décrits chez *A. baumannii* sont les dérivés de type IMP, VIM, SIM et NDM.

En Asie, IMP-1[83] et IMP-10[41] ont été décrits chez *A. baumannii*, au Japon ils ont aussi été trouvés chez d'autre bacille à Gram négatif non fermentants. IMP-4[38] et IMP-8 [205] en Chine, VIM-2 [212] et SIM-1 [102] en Corée, VIM-3 [103] et VIM-11 [104] en Taiwan.

En Europe, les MBLs qui ont été décrits chez *A. baumannii* sont IMP-2 [100] en Italie ; IMP-5 [49] en Portugal ; VIM-1 [194] et VIM-4 [62] en Grèce.

Un des derniers déterminants décrits, NDM-1 (New-Delhi Métallo- β -Lactamase), a notamment largement été médiatisé et son importante capacité de dissémination cause un réel problème de santé publique [164], NDM-1 a été découvert pour la première fois en 2008 chez un patient suédois rapatrié après avoir été hospitalisé à New Delhi (*Klebsiella pneumoniae*/ *Escherichia coli*) [93] et en 2010 chez *A. baumannii* en Inde [85].

2.4.2.1.3.2. Carbapénèmases de classe D

Les oxacillinases en général hydrolysent l'oxacilline, la méthicilline, cloxacilline et la Benzylpénicilline, et leur activité est inhibée par NaCl [75], De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des β -lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G mais l'évolution par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre a du avoir lieu comme pour les dérivés de TEM/SHV.

Des oxacillinases aux propriétés de carbapénèmases sont identifiées chez *A. baumannii*, ces oxacillinases sont de trois grands types : OXA-23, OXA-24/OXA-40 et OXA-58. Elles confèrent des degrés variables d'hydrolyse des Carbapénèmes dépendant de leur niveau d'expression [75].

Les oxacillinases (CHDLs) telles que OXA-23, initialement dénommée ARI-1 « *Acinetobacter* résistant à l'imipénème-1 » a été identifiée pour la première fois en Ecosse [139]. Le gène OXA-23, chez *A. baumannii*, a été décrit sur plusieurs types de transposons (Tn 2006, Tn2007 et Tn2008) localisés au sein du chromosome ou sur différents plasmides, démontrant la grande diversité des voies de dissémination de l'enzyme [125]. Ce gène a été identifié à travers le monde entier chez *A. baumannii* [88].

OXA-24, il est moins fréquent que OXA-23 il a été identifiée dans plusieurs régions en Europe [156] et en Algérie [9].

OXA-58, ce gène a été initialement localisé sur un plasmide chez *A. baumannii* [148]; Depuis, il a été identifié dans le monde entier : Europe [40], Argentine [121], Australie [142] et Etats-Unis [33], et en Afrique du nord comme l'Algérie [55] et la Tunisie [147]. Et OXA-143 identifiée à partir d'un isolat *A. baumannii* du Brésil [77].

Certains auteurs ont évoqué la possibilité d'une surexpression de l'oxacillinase naturelle de *A. baumannii* (OXA-51 et ses variantes) par insertion de IS*Aba1* en amont du gène codant pour cette β -lactamase [195]. Cependant, la réelle contribution de la structure IS*Aba1*-gène de type *bla*_{OXA-51} à la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* fait débat puisque cette structure a été identifiée dans des souches *A. baumannii* résistantes et sensibles aux Carbapénèmes.

2.4.2.2. Mécanismes de résistance non-enzymatiques

Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* sont moins fréquents que les mécanismes enzymatiques mais font l'objet d'un nombre croissant de publications. De plus, les mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques peuvent être associés dans une même souche de *A. baumannii*.

2.4.2.2.1. Diminution de la perméabilité membranaire

Des modifications de la perméabilité membranaire de *A. baumannii* peuvent entraîner une résistance aux carbapénèmes. Ainsi, la perte de la protéine de membrane externe CarO, secondaire à l'interruption du gène *carO* par différentes séquences d'insertion (notamment IS*Aba825*) peut être à l'origine d'une résistance aux carbapénèmes [127]. Un site spécifique de liaison à l'imipénème a récemment été mis en évidence pour la première fois au sein de CarO. De manière inattendue, aucun site de liaison au Méropénème n'a été identifié dans cette porine, faisant évoquer la possibilité de l'implication d'une autre protéine de membrane [34]. Une étude récente en Argentine rapporte une grande diversité des séquences de *carO* au sein d'une population qui possède *A. baumannii* [126]. Cet échange de variant de *carO* pourrait représenter une stratégie au sein de la population de *A. baumannii* étudiée afin de survivre dans différentes conditions environnementales.

2.4.2.2.2. Efflux

L'implication de systèmes d'efflux naturels ou acquis dans la multirésistance aux antibiotiques chez *A. baumannii* est de plus en plus étudiée [45].

Parmi les superfamilles de pompes d'efflux, les systèmes RND (Resistance-Nodulation-Division) sont les plus prévalent chez *A. baumannii* [46;50;109;112]. Les pompes RND comme AdeABC ou AdeIJK présentent typiquement un large spectre de substrats incluant des antibiotiques, des antiseptiques ou des détergents. La surexpression de AdeABC est associée à une augmentation du niveau de résistance à l'imipénème et au mérépénème, surtout lorsqu'elle est associée à l'expression d'enzymes de type CHDL [75]. La pompe AdeIJK est capable d'effluer les β -lactamines, le chloramphénicol, les tétracyclines, l'érythromycine, les lincosamides, les fluoroquinolones, l'acide fusidique, la rifampicine, la novobiocine et le triméthoprim [50].

2.4.2.2.3. Modification de PLPs

Une modification des PLPs à l'origine de la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* n'a été que très rarement investiguée mais il semble que la régulation de l'expression des PLPs puisse être associée à une diminution de sensibilité aux carbapénèmes [61].

2.5. Résistance aux aminosides

Depuis 1995, 80% des souches de *A. baumannii* isolées en France, en Europe ainsi qu'aux Etats-Unis sont résistantes à au moins un des quatre principaux aminosides utilisés en pratique médicale (gentamicine, tobramycine, amikacine, netilmicine).

La résistance aux aminosides est essentiellement due à l'acquisition de plasmides, d'intégrons ou de transposons responsables de la production d'enzymes modificatrices. Les trois types d'enzymes inactivant les aminosides ont été décrits chez *A. baumannii* : aminoside acétyltransférase AAC, aminoside nucléotidyl-transférase ANT, aminoside phosphotransférase APH.

En Europe, 84% des isolats de *A. baumannii* expriment au moins deux enzymes d'inactivation des aminosides [13;52].

Les enzymes les plus fréquemment rencontrées chez *A. baumannii* sont AAC(3)-I et ANT(3'')-I ou encore AAC(3)-II, AAC(6')-I, ANT(2''), APH(3')-I et APH(3')-VI [174] et

Les gènes codant pour des enzymes inactivant les aminosides sont sous forme de gènes cassettes au sein des intégrons chez *Acinetobacter* spp.

Récemment, la méthylation de l'ARNr 16S par la protéine codée par le gène *armA* a été décrite au Japon, en Corée de Sud et aux Etats-Unis [143]. Ce gène plasmidique est associé au transposon Tn1548 [53]. Les principales enzymes d'inactivation des aminosides sont résumées dans le tableau 2.

Tab.2. Enzymes d'inactivation des aminosides les plus communes chez *A. baumannii*

Enzymes	Noms	Substrats préférentiels
Acétylases	AAC(3)-I	Gentamicine
	AAC(3)-II	Gentamicine, Tobramycine, Netilmicine
	AAC(6')-I	Tobramycine, Netilmicine, Amikacine
	AAC(6')-II	Gentamicine, Tobramycine, Netilmicine
Adénylases	ANT(2'')-I	Gentamicine, Tobramycine
	ANT(3'')(9)	Streptomycine, Spectinomycine
Phosphorylases	APH(3')-I	Kanamycine, Néomycine
	APH(3')-VI	Kanamycine, Néomycine, Amikacine, Isépamicine
Méthylases	ArmA	Gentamicine, Tobramycine, Amikacine

2.6. Résistance aux fluoroquinolones

Acinetobacter est naturellement résistant à l'acide pipémidique, mais était sensible à l'acide nalidixique jusque dans les années 1970. La résistance aux fluoroquinolones est apparue très rapidement après l'introduction de ces molécules en thérapeutique.

Les mécanismes de résistances décrits sont liés à des mutations dans la cible des quinolones que sont les topoisomérases de type II (ADN gyrase et topoisomérase IV) et notamment au sein de courtes régions répétées (Quinolone Resistant Determinant Region). Ces mutations se situent au niveau des gènes codant pour une sous-unité de l'ADN gyrase, ou pour une sous-unité de la topoisomérase IV, ParC [13]. Les mutations dans le gène *parC* interviennent dans des souches où *gyrA* est déjà muté entraînant des niveaux de résistance

très élevés à la ciprofloxacine. Les systèmes d'efflux de type RND AdeABC, AdeIJK et la pompe AdeM de type MATE contribuent également à la résistance aux fluoroquinolones [50;109;180].

2.7. Facteurs de pathogénicité chez *A. baumannii*

Les *Acinetobacter baumannii* sont considérés comme des bactéries peu pathogènes, provoquant des signes cliniques chez des individus affaiblis mais rarement chez des individus normaux. Les facteurs de pathogénicité des acinétobactéries sont encore mal connus.

La production de slime (polysaccharides de surface) par les souches de *Acinetobacter sp* augmente la virulence d'autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia coli*. Environ la moitié des acinétobactérioses sont des infections mixtes ce qui confère à cette observation une certaine importance clinique. Le slime, produit au cours de la phase exponentielle de croissance, inhibe la migration des granulocytes neutrophiles et possède un pouvoir toxique pour ces cellules. Toutefois, une étude portant sur 100 souches a montré que seules 14 % d'entre elles produisaient du slime.

Comme les autres bactéries à Gram négatif, les espèces du genre *Acinetobacter* possèdent un lipopolysaccharide doué de propriétés endotoxiniques : il est toxique pour la souris, pyrogène chez le lapin et il provoque une lyse des amœbocytes de limules (*Limulus polyphemus*). L'endotoxine est produite *in vivo* car une réaction positive au test limule est observée au cours des septicémies [82].

La présence d'une capsule polysaccharidique est considérée comme un facteur de virulence car elle s'oppose à la phagocytose. De plus, avec les fimbriæ, elle pourrait jouer un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales [82].

Toutefois, la capsule pourrait rendre la surface des bactéries plus hydrophiles alors que les souches de *Acinetobacter baumannii* isolées de dispositifs médicaux (cathéters, sondes trachéales, sondes vésicales, prothèses...) présentent une surface plus hydrophobe que les souches de la même espèce isolées d'individus sains. L'hydrophobicité de surface d'un micro-organisme est un facteur important pour expliquer l'attachement sur les divers polymères constitutifs des biomatériaux et cette propriété jouerait un rôle dans la virulence.

Les souches hémolytiques produisent une phospholipase C qui hydrolyse la lécithine, la phosphatidyl-éthanolamine et la sphingomyéline et qui est cytotoxique pour les leucocytes.

La captation du fer est sous la dépendance d'un sidérophores du type aéro bactéine et appelé acinéto bactéine et de protéines de membrane externe dont la synthèse est réprimée en présence de fer dans l'environnement.

2.8. Epidémiologie

Acinetobacter baumannii est un germe pathogène ubiquitaire causant aussi bien des infections communautaires que des infections liées aux soins, ces dernières étant beaucoup plus fréquentes. Ce microorganisme a émergé récemment comme une cause majeure d'infections nosocomiales en raison de sa multi-résistance aux antibiotiques et de sa propension à causer des épidémies nosocomiales concernant souvent plusieurs services d'hospitalisations et particulièrement les services de réanimation. La survenue d'épidémie est favorisée par sa tolérance à la dessiccation et son antibio-résistance contribuant au maintien de cette bactérie dans l'environnement hospitalier.

Au total, l'épidémiologie de *Acinetobacter baumannii* est souvent complexe avec la coexistence d'infections épidémiques et endémiques, ces dernières étant favorisées par la pression de sélection des antibiotiques. Le seul point positif est que les infections potentiellement sévères comme les bactériémies ou les pneumonies en soins intensifs nécessitant une intubation ne semblent pas être associées à une augmentation du taux de mortalité ou à une augmentation de la durée d'hospitalisation [66].

2.9. Infection nosocomiale à *A. baumannii* en réanimation

L'incidence des infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* a considérablement augmenté durant les 30 dernières années en particulier dans les services à haut risque (unité des soins intensifs) [12]. En 1995, les *Acinetobacter* sont isolés dans 9 % des infections nosocomiales alors qu'ils ne représentaient que 1 % de celles-ci en 1983 [81].

Les infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* sont devenues de plus en plus fréquentes parmi les patients en état sévère dans les unités de réanimation à travers le

monde. Ces isolats de *A. baumannii* sont souvent résistants à la plupart des antibiotiques et une résistance prouvée à tous les antibiotiques d'isolats de *A. baumannii* a été rapportée.

Les infections à *A. baumannii* sont le plus souvent liées à aux moins une manœuvre invasive (pose de sonde, intubation, ventilation artificielle et une intervention chirurgicale). Les actes invasifs quels qu'ils soient (sonde, cathéter ou chirurgie) favorisent les infections nosocomiales à *A. baumannii* et sont en cause dans 50 % des cas. D'ailleurs les services où on a un recours fréquent à ces procédés invasifs sont les unités des soins intensifs. Au niveau de ces services, le risque d'infection est aussi élevé à cause de l'utilisation intensive d'antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines de troisième génération, l'imipénème et les aminosides.

PARTIE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Partie 2: Matériel et Méthodes

1. Objectifs

L'étude prospective que nous avons menée sur la caractérisation de l'antibio-résistance des souches de *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* du groupe des bacilles à Gram négatif non fermentants rendu responsables d'infection chez des patients hospitalisés au service de réanimation CHU- Annaba, sur une période de onze mois (Novembre 2010 à Septembre 2011).

Au courant de cette période, un total de 64 bacilles à Gram négatif non fermentants (30 *Acinetobacter baumannii* et 34 *Pseudomonas aeruginosa*) ont été isolés de prélèvements, recueillis aux niveaux des unités de soins intensives.

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* surviennent essentiellement en réanimation et plus particulièrement chez des patients immunodéprimés [65;66;183].

Les souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* sont parmi les espèces les plus fréquentes après *Staphylococcus aureus*, responsables d'infection nosocomiale dans les unités de soins intensifs.

Par le présent travail, nous voulons étudier la résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés des prélèvements (aspiration trachéale, urine, prélèvement de plaies, pus, sang) des patients hospitalisés au niveau des services de réanimation CHU Annaba-Algérie. On a alors effectué l'identification des souches isolées, puis la détermination moléculaire des gènes de résistance et leur séquençage. Les séquences obtenues sont analysées par le logiciel « codan code aligner » et soumises via Internet, à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), pour comparaison avec les séquences homologues, contenues dans la banque informatique internationale dénommée « GenBank ».

Les examens bactériologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire central de microbiologie de l'hôpital de Dorban Annaba- Algérie, et l'étude de biologie moléculaire a été réalisée en collaboration avec l'Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, UMR CNRS-6236, IRD189, IFR48, Faculté de Médecine et de pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

Durant notre étude, deux aspects nous ont paru intéressants à étudier et à analyser. Le premier étant la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa* et

Acinetobacter baumannii qui sont les principaux bacilles à Gram négatifs non fermentants retrouvés dans les services de réanimation. Le second étant les conséquences attribuables à la résistance aux carbapénèmes.

Nous avons effectué un travail dont l'objectif est d'évaluer la résistance aux antibiotiques, particulièrement les carbapénèmes car ils sont utilisés en première intention en réanimation surtout dans les infections nosocomiales et aussi leur émergence en Algérie et dans le monde.

2. Isolement et identification des souches isolées

Les souches cultivées sur milieu Trypticase Soja (TSA) ou gélose au sang sont incubées à 37°C. L'identification des bacilles à Gram négatif non fermentants collectées a été réalisée par deux méthodes :

2.1. Système API-20NE (BioMérieux, Meylan, France) : est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentants. Il comporte 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. C'est une mini galerie biochimique qui nous permet d'étudier les caractères biochimiques des bactéries afin de les identifier.

2.2. La spectrométrie de masse MALDI-TOF(Microflex).

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse, couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = **M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = **T**ime-**O**f-**F**light mass spectrometry) [173].

La principale fonction de la spectrométrie de masse MALDI TOF (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), en microbiologie clinique, est l'identification des micro-organismes par l'analyse de leurs protéines totales. La spectrométrie de masse combinée à une désorption- ionisation laser assistée par une matrice, d'une bactérie isolée, permet de réaliser cette identification en quelques minutes et avec une haute précision [173].

Le protocole appliqué pour identifier les souches bactériennes, collectées dans les services de réanimation est le suivant:

➤ **Nettoyage de la plaque – cible** : consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude, et à verser de l'éthanol à 70% que l'on frotte avec du papier. Ensuite, on plonge la cible dans

l'éthanol pendant 15 min, puis on la frotte avec 500µl de TFA (Acide TriFluorocétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC et on la laisse sécher à l'air libre.

➤ **Préparation de la matrice** : la matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident.

Dans cette étude, nous avons utilisé, sous une hotte chimique, un protocole de préparation de la matrice. Dans un tube à Eppendorf, on dispose les éléments suivants en respectant la procédure suivante :

- 2 spatules d'alpha- cyano- 4 hydrocinnamic acide
- 500 µl d'acetonitril HPLC
- 250 µl de TFA à 10% (acide trifluorocétique)
- 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer pendant 10 minutes dans un Bain à ultrasons
- Centrifuger 5 minutes à 13000 RPM
- Transférer le surnageant dans un tube à Eppendorf propre.

Ainsi la matrice prête à être utilisée.

➤ **Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométrique** :

- Sous un PSM (poste de sécurité microbiologique), on prélève les bactéries à identifier, à partir d'une culture bactérienne de 24 heures, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5 mm², sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris du laser. Pour chaque souche, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.
- On dépose 2µl de matrice sur chaque spot.
- On laisse sécher sous la hotte pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

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

- La cible était ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et exposée sous- vide, aux tris du laser.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.
- Lancer le spectromètre de masse : Microflex.

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

MALDI TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0. La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue, ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par la MALDI TOF est ≥ 1.9 [173].

3. Antibiogramme selon le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM)

La méthode utilisée est la technique de la diffusion des disques, sur un milieu gélosé. Les antibiogrammes des souches *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisés sur des boîtes de Muller-Hinton suivant la technique recommandée par le comité de l'antibiogramme, de la société Française de microbiologie (CA-SFM).

Les géloses ont été ensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension de germes à 0.5 Mac Farland (une densité optique égale 0.2 à 650 nm) diluée au 1/10 de façon à obtenir une concentration finale de 10^7 UFC/ml, conformément aux recommandations de la CA-SFM (www.sfm.asso.fr). Des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses, à l'aide d'un distributeur automatique. Les antibiotiques testés sont les suivants : Ticarcilline, Pipéracilline, ticarcilline / acide clavulanique, Pipéracilline / tazobactam, cefsulodine, Ceftazidime, Imipénème, Aztréonam, Amikacine, Néomycine, Ciprofloxacine, Fosfomycine, Gentamicine, Colistine et Rifampycine.

Les boîtes ont été mises à incuber pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés par deux fois. L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (communiqué du CA-SFM, 2010).

4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient pré-établi de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en $\mu\text{g/ml}$ d'une souche testée en milieu gélosé.

Le gradient couvre une rangée de concentrations allant de 0,016 à 256 $\mu\text{g/ml}$ ou 0,002 à 32 $\mu\text{g/ml}$ selon l'antibiotique. L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Muller Hinton. Lorsqu'une bandelette Etest est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose.

Un gradient continu est exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support. Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible. Une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

5. Recherche phénotypique des carbapénémases

La recherche des carbapénémases par les tests phénotypiques a été réalisé suite au résultats de l'antibiogramme, Où nous avons noté une résistance très élevée à l'imipénème. Nous nous sommes intéressés particulièrement à cette antibiotique, car il est considéré comme l'antibiotique de choix contre les infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs. Cette résistance pose un énorme problème dans la guérison et la survie des patients.

5.1. Test d'imipénémase par MALDI TOF ultraflex

La spectrométrie de masse générée par une source d'ionisation laser, assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF) est appliquée pour la détection de la production de carbapénémase chez les souches étudiées [87].

Le protocole utilisé pour la détection des carbapénémase par **MALDI TOF ultraflex** est le suivant :

- **Nettoyage de la plaque – cible** : le protocole utilisé pour le nettoyage de la cible consiste à mettre la cible dans un bain d'isopropanol à 50% et soniquer pendant 15 min, et on rince avec de l'eau HPLC et on laisse sécher à l'air libre.

➤ **Préparation de la matrice :**

- Sous une hotte chimique, dans un tube à Eppendorf, mettre 10 mg de HCCA
- Ajouter 1 ml d'acétone
- Soniquer 2 min (la solution doit être trouble)
- Enlever 660 µl et ajouter 660 µl d'éthanol
- Ajouter 1 µl de TFA.

La matrice est prête à être utilisée

➤ **Préparation des échantillons :** déposer une colonie bactérienne de 24 heures, dans une solution d'imipénème (Tienam, 500 mg, MSD, Paris, France) dilué dans 0,45% NaCl et incuber à 37°C pendant 4 heures. Après l'incubation, le mélange est centrifugé et on utilise le surnageant.

Sur une cible (Bruker Daltonics GmbH, Brême, Allemagne; MTP AnchorChip™ 384 Cible TF), on dépose 1 µl de surnageant (Echantillon à analyser) puis on ajoute 1 µl de matrice et laisser sécher à température ambiante.

Remarque : sur chaque cible on dépose deux souches de référence, utilisées comme témoins : *Escherichia coli* ATCC 25922 comme témoin négatif et *Klebsiella pneumoniae* (« Kpnasey » souche de référence pour NDM-1) comme témoin positif.

Après séchage, la cible est introduite dans un spectromètre de masse Ultraflex (Bruker Daltonics).

Les résultats ultraflex traduisant la présence ou l'absence des pics représentant l'imipénème et son métabolite naturel sont analysés à l'aide d'un logiciel Flex Control 3.0.

Les résultats sont interprétés comme positif à la production des carbapénémase, si le pic spécifique de l'imipénème à 300 m/z disparaît complètement au cours de la période d'incubation de 4 heures avec une augmentation/visualisation du pic spécifique du métabolite à 254 m/z. On confirme la production d'une carbapénémase par le calcul du Ratio.[87]

$$\text{Ratio} = \frac{\text{aire sous la courbe du pic de l'imipénème}}{\text{son métabolite}} < 0.5$$

La présence du pic spécifique de l'imipénème à 300 m/z au cours de la période d'incubation de 4 heures avec un Ratio (rapport de l'aire sous la courbe du pic de

l'imipénème / son métabolite) > 0.5. [87] Ce qui prouve qu'on est en présence de souches *A. baumannii* sensibles à l'imipénème.

5.2. Test de Hodge

Les souches *A. baumannii* à tester sont ensemencées sous forme de stries déposées à partir du centre jusqu'à la périphérie de la boîte contenant la gélose MacConkey, préalablement ensemencée avec une souche *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à tous les antibiotiques).

Après 15min, un disque d'imipénème est appliqué au centre et la boîte est incubée à 37°C pendant 18 à 20 heures.

La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture de *E. coli* indique la présence d'une carbapénémase [101].

5.3. Test de synergie EDTA-IMP : Détection des metallo- β -lactamases (M β L)

Un antibiogramme est réalisé pour *Pseudomonas aeruginosa* selon les recommandations du CA-SFM sur la gélose Mueller Hinton.

On a utilisé deux méthodes :

- Un disque d'imipénème (10 μ g) est déposé à deux centimètres d'un disque vierge auquel on ajoute 10 μ l d'EDTA ; Après incubation à 37°C pendant 24heures, si on observe une synergie entre les deux disques, on considère que ces souches sont productrices de M β L.
- Dans la même boîte de gélose ensemencée, on dépose deux disques d'imipénème à deux centimètres d'intervalle auxquels on rajoute à l'un d'eux 4 μ l d'EDTA (solution 0.5M, pH8). Les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C. Si les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM–EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul d'au moins 6mm, elles sont considérées comme souches productrices de M β L [209] .

6. Recherche moléculaire des β -lactamases

Au cours de notre travail, on a recherché l'identification des β -lactamases de classe A, classe B, classe C d'Ambler. Les amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de différents gènes sont présentées dans les tableaux 7 et 8.

6.1. Recherche moléculaire des carbapénémases

6.1.1. Polymerase Chain Réaction (PCR) en temps réel

La PCR, en temps réel, est une technique qui repose d'une part sur l'amplification des acides désoxyribonucléiques (ADN) par une ADN polymérase, à partir d'amorces sens et anti-sens, et d'autre part sur la détection régulière d'un signal fluorescent émis par une sonde TaqMan®, qui porte à son extrémité 5' un Fluorophore, et à son extrémité 3' un Quencher. Ce dernier absorbe la fluorescence du Fluorophore, on remarque qu'aucun signal n'est émis. [Fig. 4. (A)].

Un cycle de PCR, ou cycle d'amplification est composé d'une étape de dénaturation de l'ADN, suivie de l'hybridation des amorces sur leur séquence spécifique et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase. Les étapes d'hybridation et d'élongation peuvent être réalisées à la même température. Ce qui permet de réduire considérablement le temps de la PCR en temps réel. [Fig. 4. (A)].

Lors de la dénaturation, les deux brins d'ADN sont séparés, puis les amorces se fixent sur leur séquence cible au cours de l'hybridation. Pendant l'élongation, la polymérase qui possède une activité 5'-exonuclease, va cliver la sonde TaqMan®. Le Fluorophore va donc s'éloigner du Quencher, qui n'absorbera plus la fluorescence émise par le premier, et un signal pourrait être détecté. [Fig. 4. (B)].

L'amplification par PCR, corrélée à un nombre de Fluorophore clivés (donc émettant un signal fluorescent) augmente exponentiellement. [Fig. 4. (C)].

Ceci va se traduire par une courbe de PCR en temps réel, retraçant l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycle PCR. Au début, le signal fluorescent émis ne se démarque pas du bruit de fond. Ensuite, une phase exponentielle d'amplification du signal apparaît jusqu'à une phase plateau, correspondant au signal maximal détectable lorsque toutes les sondes ont été clivées. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, alors, on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. Le cycle seuil correspond au nombre de cycle de PCR qui doivent avoir lieu avant le début de la phase exponentielle. [Fig. 4. (D)].

Le protocole utilisé dans ce travail est le suivant : dans une plaque pour Thermocycleur **Stratagème MX 3000P**, on dépose 20 µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 3 ci-dessous) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

Le dépistage des gènes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{NDM-1} et *bla*_{KPC} a été réalisé sur les souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème en utilisant des amorces et des sondes spécifiques (tab. 5).

Pour valider la réaction de la PCR en temps réel, diverses souches de référence sont utilisées :

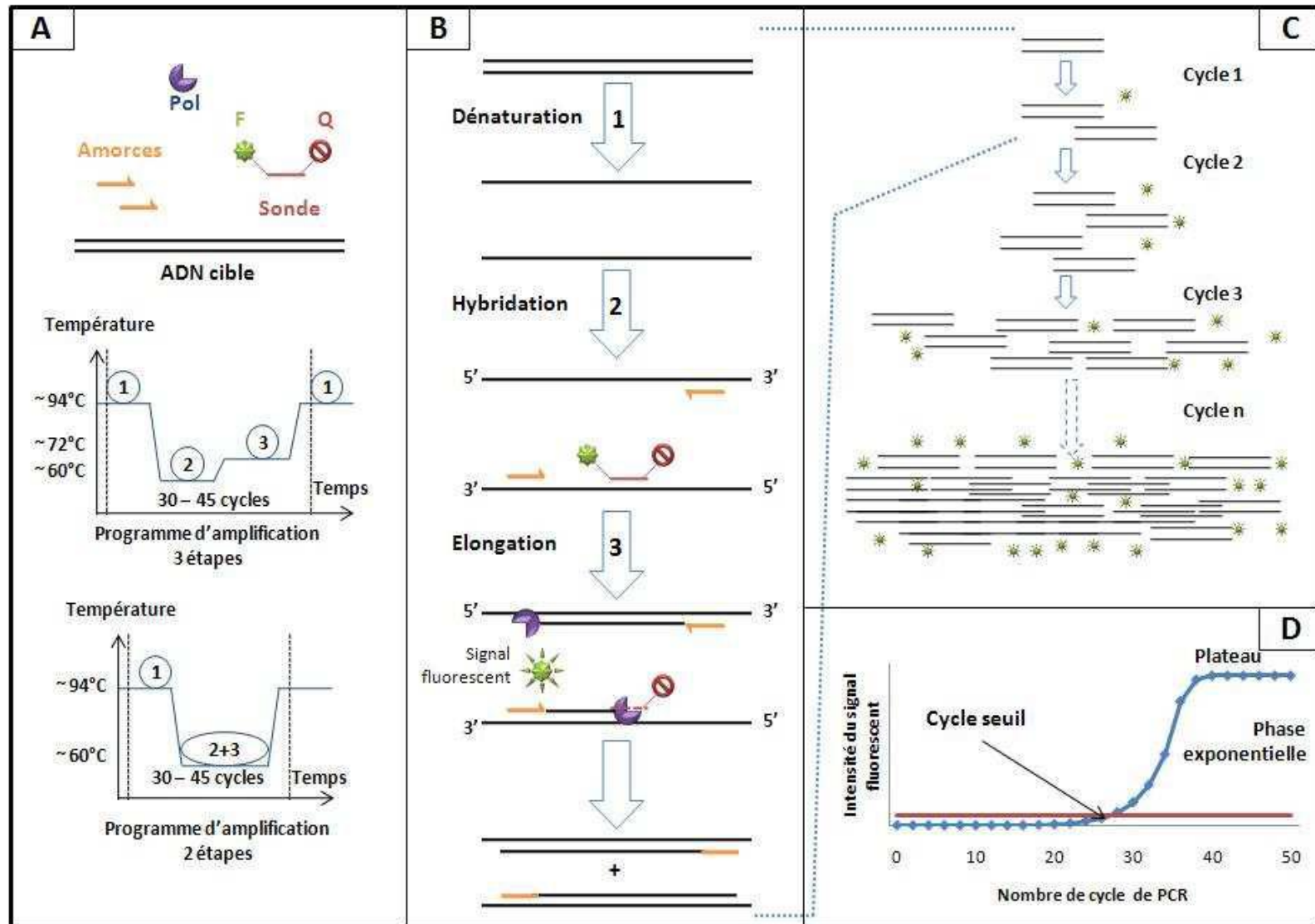
- *A. baumannii* (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} and *bla*_{OXA-51}). [94]
- *Klebsiella pneumoniae* UAA2984 (*bla*_{VIM}) [P. Courvalain Institut Pasteur, Paris, France]
- *A. baumannii*UAA2529 (*bla*_{IMP}) [P. Courvalain Institut Pasteur, Paris, France]
- *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 (*bla*_{KPC}) [P. Courvalain Institut Pasteur, Paris, France]
- *Klebsiella pneumoniae* [Kpnasey (*bla*_{NDM-1})] [51]

Tab.3. Composition des mélanges réactionnels pour les PCR et en temps réel

Mix RT-PCR pour Une réaction	Quantité PCR en temps réel
Quantitect Probe PCR Master Mix	10 µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
Sonde	2 µl
H ₂ O physiologique	2 µl
ADN à amplifier	5 µl
Volume total	20 µl

Tab.4. Programme de l'amplification de la PCR en temps réel

Température	50°C	95°C	95°C	60°C	45°C
Temps	2 min	15 min	1 sec	35 sec	30sec



Pol = Polymérase, F = Fluorophore, Q = Quencher

Fig. 4. Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®)

Tab.5. Amorces utilisées pour les PCR et en temps réel

Gene	amorce	Séquence des amorces	Taille amplicon	Ref
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA23-F	TGCTCTAAGCCGCGCAAATA	130pb	[94]
	OXA23-R	TGACCTTTTCTCGCCCTTCC		
	OXA23-probe	FAM-GCCCTGATCGGATTGGAGAACCA-TAMRA		
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA24-F	CAAATGAGATTTTCAAATGGGATGG	123pb	
	OXA24-R	TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT		
	OXA24-probe	FAM- GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA-TAMRA		
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA58-F	CGCAGAGGGGAGAATCGTCT	102pb	
	OXA58-R	TTGCCCATCTGCCTTTTCAA		
	OXA58-probe	FAM-GGGGAATGGCTGTAGACCCGC-TAMRA		
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	117pb	
	OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
	OXA51-probe	FAM-AGCTCGTCGTATTGGACTTGAAGTC-TAMRA		
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM1-F	GCGCAACACAGCCTGACTTT	155pb	[51]
	NDM1-R	CAGCCACCAAAAGCGATGTC		
	NDM1-probe	FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA		
pb: paire de base ; F: Forward ; R: Reverse ; Ref : Référence				

pb: paire de base ; F: Forward ; R: Reverse ; Ref : Référence

6.1.2. Polymérase Chain Réaction(PCR) standard

Le principe de la Polymérase Chain Réaction (PCR), consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible. Les réactions d'amplification des gènes codant pour les carbapénémase sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques (tab. 7), dans un thermocycleur de type BioRad. Nous avons désigné certaines amorces grâce au logiciel primer 3.

Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés. Les séquences sont comparées à celles déposées dans une banque de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

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

- Pipeter 20 µl de Protéase QIAGEN (ou la protéinase K) et le mettre dans un tube à Eppendorf de 1.5 ml.
- Ajouter 200 µl d'échantillon (suspension bactérienne) dans le tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Ajouter 200 µl de Buffer AL (tampon) à l'échantillon. Mixer (vortex) pendant 15 s. afin d'assurer une lyse efficace. Il est essentiel que l'échantillon et le Buffer AL soient bien mélangés pour obtenir une solution homogène.
- Incuber ce mélange pendant 30 min à 70°C.
- Centrifuger 1min à 13000 rpm (brièvement) le tube Eppendorf de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes à l'intérieur du couvercle
- Après ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon et mélanger à nouveau en vortexant pendant 15 s. Le mélange dans l'Eppendorf est centrifugé pendant 1min à 13000 rpm.
- Transvaser soigneusement le mélange du tube Eppendorf dans la colonne QIAamp Mini [la colonne contient un tube avec filtre qui est placé dans un tube collecteur (fourni) 2 ml] sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min. Ensuite jeter le contenu du tube collecteur.
- Ouvrir la colonne QIAamp Mini et ajouter 500 µl de Buffer (tampon) AW1 sans mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min. Après la centrifugation jeter le contenu dans un tube collecteur (fourni) contenant le filtrat.

- Ajouter 500 µl du Buffer (tampon) AW2 dans la colonne QIAamp Mini, fermer le capuchon et centrifuger à vitesse maximale (20000 x g; 14000 rpm) pendant 3 min.
- Placer la colonne QIAamp Mini filtre dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml (non fourni) et jeter l'ancien tube collecteur (fourni) contenant l'effluent. Centrifuger à fond, accélérer pendant 1 min. Cette étape permet d'éliminer le risque de tampon AW2 report possible.
- Placer la colonne QIAamp Mini spin dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml (non fourni) et jeter le tube contenant le filtrat. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp Mini rotation et ajouter 200 µl de tampon AE ou d'eau distillée. Incuber à température ambiante (15-25°C) pendant 1 min, puis centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min. Et récupérer le contenu de l'Eppendorf qui est de l'ADN extrait. Puis jeter la colonne QIAamp Mini spin. L'incubation de la colonne QIAamp Mini chargée de tampon AE ou d'eau pendant 5 min à température ambiante avant centrifugation augmente généralement le rendement d'ADN.

❖ Protocole d'une PCR standard

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR standard est le suivant : dans une plaque pour Thermocycleur BioRad on dépose 25 µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 6 ci-dessous) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

Le dépistage des gènes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC} et ISAb_a a été réalisé sur les souches *A. baumannii* et les gènes *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{GIM} et class 1 integron pour les souches de *P. aeruginosa*, résistantes à l'imipénème en utilisant des amorces spécifiques (tab. 7). Pour valider la réaction de la PCR standard diverses souches de référence ont été utilisées.

Tab.6. Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards

Mix PCR standard pour Une réaction	Quantité PCR standard
Quantitect Probe PCR Master Mix	12.5 µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
H2O UP	6.5 µl
ADN à amplifier	5 µl
Volume total	25 µl

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems). Une réaction de PCR classique comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec 60 secondes à 94°C (dénaturations), 50 secondes à 50-60°C (appariement des amorces, température variable selon le T_m des amorces) et 1 min 30 secondes à 72°C (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 7 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

Tab. 7. Amorces utilisées pour les PCR standard

Gene	amorce	Séquence des amorces	Taille du produit de PCR	Ref
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501pb	[196]
	OXA23-R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353pb	
	OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA24-F	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	825pb	
	OXA24-R	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC		
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA58-F	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	595pb	[167]
	OXA58-R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG		
IS <i>Aba1</i>	IS <i>Aba1</i> -F	CATTGGCATTAAACTGAGGAGAAA	451pb	
	IS <i>Aba1</i> -R	TTGGAAATGGGGAAAACGAA		
VIM-all	VIM-all-F	TGGTCTACATGACCGCGTCT	766pb	Designer dans cette étude
	VIM-all-R	CGACTGAGCGATTTGTGTG		
IMP-all	IMP-all-F	GGTGTTTATGTTTCATACATCGT	622pb	
	IMP-all-R	TTTTTACTTTCTTTTAGCCCTTT		
GIM	GIM-F	ACTTGTAGCGTTGCCAGCTT	700pb	
	GIM-R	CGGTTGCATTAATTTGTTAGAA		
NDM-1	NDM-1-F	CATTTGCGGGGTTTTTAATG	998pb	[51]
	NDM-1-R	CTGGGTCGAGGTCAGGATAG		
recA	RecA- F	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC		[95]
	RecA- R	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		
OprD	OprD-F	GGAACCTCAACTATCGCCAAG	1468	[134]
	OprD-R	GTTGCCTGTCGGTCGATTAC		
OprD2	OprD2-F	ACTTCACCGAGGGCAAGG	441	
	OprD2-R	CAGAGTTGGCGAGGAAAATC		
class 1 integron/ VIM-2	class 1 integron-F VIM-2--R	ACCGTGGAACGGATGAAG GTCATGAAAGTGCGTGGAGA	664	Designer dans cette étude
VIM-2/ <i>aacA4</i>	VIM-2-F <i>aacA4</i> -R	TGTCCGTGATGGTGATGAGT TATTCGCGTACTCCTGGAT	1400	

Tab. 8. Amorces utilisées pour les PCR standard des (BLSE, aminoside, quinolone et rifampicine)

Gene	amorce	Séquence des amorces	Taille du produit de PCR	Ref
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	840	[90]
	TEM-R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla</i> _{CTX}	CTX-F	TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA	544	[57]
	CTX-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1051	[207]
	SHV-R	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC		
<i>bla</i> _{PER}	PER-F	GTAGTATCAGCCCAATCCCC	738	
	PER-R	CCAATAAAGGCCGTCCATCA		
<i>bla</i> _{VEB}	VEB-F	GGAACAACCTTTGACGATTGA	374	[119]
	VEB-R	CCCTGTTTTATGAGCAACAA		
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	GAAAAAGCAGCTCAGATCG	597	
	GES-R	CAACAACCCAATCTTTAGGA		
<i>aacA4</i>	<i>aacA4</i> -F	GACATAAGCCTGTTCGGTT	395	[129]
	<i>aacA4</i> -R	CTCCGAACCTCACGACCGA		
<i>AadA</i>	<i>aadA</i> -F	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812	
	<i>aadA</i> -R	TTGTACGGCTCCGCAGTG		
<i>QnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543	[190]
	<i>qnrA</i> -R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA		
<i>QnrB</i>	<i>qnrB</i> -F	GACAGAAACAGGTTCACCGGT	469	
	<i>qnrB</i> -R	CAAGACGTTCCAGGAGCAACG		
<i>GyrA</i>	<i>gyrA</i> -F	AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT	344	[138]
	<i>gyrA</i> -R	GCCATACCTACGGCGATACC		
<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i> -F	AATTACAAGCAGGTGCAAGGA	414	[110]
	<i>arr-2</i> -R	TTCAATGACGTGTAAACCACG		

6.1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

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

➤ Protocole de préparation du gel d'agarose

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.
- Ajouter la Solution de bromure d'éthidium BET (3 fois 31.5 µl pour 50ml) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.
- Laisser refroidir jusqu'à solidification de gel.

➤ Electrophorèse des produits d'amplification

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 0.5X (le gel doit être totalement émergé).
- Déposer 4µl du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019)] dans le premier puits.
- Mélanger 4 µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du Blue Juice
- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif et un témoin positif
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (environ 30 min).
- Une fois la migration finie, Placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

➤ Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de poids moléculaire (100 paires de base) en utilisant le témoin.

6.1.4. Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée [171], en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3730 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur.

- **Purification**

Après électrophorèse, on vérifie sur le système d'imagerie à UV, la présence des bandes ADN.

On ajoute au produit PCR 100 µl d'eau ultra pure, puis on transfère le tout dans une plaque à filtre pour faire la première purification. Ensuite, on dépose cette plaque à filtre sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Enfin, on ajoute 50 µl d'eau ultra pure et agite pendant 20 min sur un agitateur.

Le produit est purifié et prêt pour la PCR Big Dye.

- **PCR Big Dye**

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR Big Dye est le suivant : dans une plaque de thermocycleur Bio-rad on dépose 20 µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 9 ci-dessous) dans chaque puits.

Tab. 9. Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye

Composants pour Forward	Composants pour Reverse	Quantité PCR BigDye
Buffer	Buffer	3 µl
Mix Big Dye	Mix Big Dye	2 µl
Amorce F	Amorce R	1 µl
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4 µl
H₂O UP	H₂O UP	10 µl
Volume total	Volume total	20 µl

Pour chaque amorce, on fait 2 mélanges réactionnels séparés, un pour le Forward et l'autre pour le Reverse, exécuté selon le programme porté dans le tableau 10.

Tab. 10. Programme de l'amplification de la PCR Big Dye

Température	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Temps	2 min	10 sec	5sec	1 min15sec	∞

- **Purification par Sephadex**

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex G 50 de la marque sigma, on met la poudre de Sephadex dans les puits de la plaque auxquels on ajoute 300µl d'eau ultra pure et laisser reposer 2 à 3 heures.

Après avoir mis la plaque à filtre au dessous d'une plaque contenant des puits, on réalise une centrifugation à 12000 rpm pendant 10min à 10°C pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté.

On met par la suite, les produits PCR Big Dye dans la plaque à filtre qui sera placée sur une deuxième plaque à puits pour collecter après centrifugation (à 12000 rpm pendant 10min à 10°C) les produits PCR purifiés. Cette plaque est ensuite recouverte par un tapis de protection.

Le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

- **Séquençage**

Sur la machine du séquenceur Automate ABI 3730, remplir les fiches pour séquençage sur le logiciel. Mettre la plaque pour le séquençage sur le support et la déposer dans le séquenceur **Automate ABI 3730**. Lancer le séquençage.

6.1.4.1. Analyse des séquences

Les séquences brutes obtenues par le séquençage ont été analysées et corrigées par le logiciel codon code Aligner. Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée «GenBank ».

Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches [3]. Ensuite déterminer leur affiliation phylogénétique.

Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega4 selon la Méthode du « Neighbor-joining » [185].

6.2. Recherche moléculaire des β -lactamine à spectre élargi (BLSE)

Au cours de notre travail, on a recherché l'identification des (BLSE) β -lactamases de classe A ; *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES} par PCR standard. (Tab. 8).

7. Recherche moléculaire de la résistance associée (aminoside, quinolone et rifampicine)

- **Résistance aux aminosides**

Plusieurs gènes codant pour les enzymes modificateurs des aminoglycosides sont étudiés : aminoglycoside adényltransferase *aadB* et aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase *aacA4*. (Tab. 8).

- **Résistance à la rifampicine**

Recherche de la présence du gène *arr-2*, analysé par PCR standard. (Tab. 8).

- **Résistance aux quinolones**

La résistance aux quinolones est analysée en amplifiant les gènes *qnrA* et *qnrB*, dans le but de détecter des mutations associées à la résistance aux quinolones dans l'ADN gyrase. (Tab. 8) sus-cité.

8. Typage moléculaire des souches

8.1. Génotypage (*recA*)

Le génotypage est déterminé en comparant les séquences du gène *recA* [à l'aide des amorces *recA* Forward (CCTGAATCTTCTGGTAAAAC) et *recA* reverse (GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC)] des 30 souches de *A. baumannii* étudiées avec des génotypes déposés dans le Site Web MLST Pasteur (www.pasteur.fr/mlst).

Après amplification et séquençage du gène *recA*, les séquences sont alignées en utilisant DNA sequence analysis softwares (ClustalX). L'arbre phylogénétique est construit avec Mega4 en utilisant la méthode Neighbour-Joining (Kimura's 2-parameter model) [185].

8.2. Multi-locus séquence typing (MLST)

Le MLST est basé sur le séquençage de 4 à 10 gènes de ménage importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques à chaque espèce.

La technique de MLST pour *P. aeruginosa* a été développée et mise au point par Curran et al., 2004 ;[48], puis modifiée par Van Mansfeld R et al., 2009 [199]. Elle est basée sur l'analyse par les séquençages nucléotidiques du polymorphisme des 7 gènes domestiques *acsA*, *aroE*, *mutL*, *ppsA*, *gua A*, *nuoD*, et *trpE* (Tab. 11), repartis sur le chromosome bactérien et conservés au cours de l'évolution.

Tab. 11. Caractéristique des 7 gènes utilisés en Multi locus séquence typing [199]

Locus	Fonction du gène	Position (pb)	Taille (pb)
<i>acsA</i>	ADN acétyl-coenzyme A synthétase	969670	390
<i>mutL</i>	mésappariements de l'ADN de réparation	5551681	442
<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvatesynthase	1914037	370
<i>aroE</i>	shikimate 5-déshydrogénase	27535	498
<i>gua A</i>	GMP synthase (PA3769)	4227237	372
<i>nuoD</i>	NADH deshydrogenase I Chain CD	2983963	366
<i>trpE</i>	Anthralite synthetase component I	670980	441

L'alignement des séquences d'un locus donné, permet de repérer les allèles différents entre eux, par des mutations et/ou recombinaisons pour chaque souche bactériennes. La combinaison des allèles obtenue à partir de chaque locus sélectionné permet de définir une séquence type, représentant un génotype multi-locus. Ces séquences types avec les allèles qu'elles défini sont consultables dans les bases de données du site web <http://pubmlst.org/paeruginosa>.

PARTIE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats

Le service de réanimation du CHU Annaba-Algérie, reçoit des malades portant des tares et même des polytraumatisés de cinq wilayas (Guelma, Taref, Skikda, Souk Ahras, Tebessa) du Nord Est Algérien. Ce qui génère une activité intense.

Durant notre travail de Novembre 2010 à septembre 2011, un total de 300 hospitalisations ont été enregistrées au niveau de ces services. Au cours de cette période, 64 épisodes infectieux à bacilles à Gram négatif non fermentants ont été confirmés, dont 30 ce sont révélées à *Acinetobacter baumannii* et 34 à *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces deux espèces du groupe des bacilles à Gram négatif non fermentants sont parmi les causes les plus fréquentes dans les infections des unités de soins intensifs, après le genre *Staphylococcus*.

Parmi les 64 patients infectés par les bacilles à Gram négatif non fermentants, on a noté neuf décès, (soit un peu plus de 14%).

Acinetobacter baumannii

L'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF- MS (Microflex) des trente souches *Acinetobacter baumannii* isolées a donné de très bons scores de 1.9 et 2.3 tableau N°12 confirmant l'identification par galerie API20-NE (BioMérieux, Meylan, France). Parmi les 30 patients infectés par ces bactéries, six sont décédés soit 20%.

Les 30 souches de *A. baumannii* sont représentées dans le tableau 12. L'âge des patients source varie de 5ans à 83 ans, où la tranche de 26ans à 60 ans est la plus exposée du fait quelle soit la population la plus active et pouvant présenter des tares (diabète, hypertension, ...etc.)

Comme le montre le tableau N°12, les souches *A. baumannii* ont été isolées à partir de divers prélèvements, surtout des aspirations trachéales qui représente 63.33% de toutes les souches. Par ailleurs, 20% on été isolés à partir de pus divers où l'infection était polymicrobienne associée aux espèces du genre *Staphylococcus* ou bien associée à *E. coli*.

Tab. 12. Caractérisation des souches *Acinetobacter baumannii* en fonction de leur score MALDI-TOF

	N° Souche	Date du prélèvement	Age	Sexe	Type de prélèvement	Mortalité	Score MALDI-TOF
Enfants	1	15/11/2010	12	M	Aspiration trachéale	-	[2.10 – 2.23]
	2	25/02/2011	11	M	Aspiration trachéale	+	[1.88 – 2.11]
	3	08/03/2011	5	F	Sang	-	[1.91 – 2.31]
	4	18/04/2011	10	F	Sonde urinaire	-	[2.02 – 2.32]
	5	18/08/2011	8	M	Plaie	-	[2.19 – 2.30]
Adulte	6	22/12/2010	39	M	Pus	-	[1.92 -2.30]
	7	28/12/2010	18	F	Aspiration trachéale	+	[2.04 – 2.31]
	8	24/02/2011	71	M	Pus	-	[1.98 – 2.12]
	9	27/02/2011	30	M	Aspiration trachéale	+	[2.25 – 2.35]
	10	15/03/2011	58	F	Aspiration trachéale	+	[1.99 – 2.31]
	11	22/03/2011	45	M	Aspiration trachéale	-	[1.91 -2.32]
	12	23/03/2011	48	F	Aspiration trachéale	-	[2.29 – 2.36]
	13	15/04/2011	29	F	Aspiration trachéale	-	[1.95 – 2.34]
	14	16/05/2011	18	F	Aspiration trachéale	-	[2.05 – 2.31]
	15	20/05/2011	68	M	Pus	-	[2.22 – 2.30]
	16	25/05/2011	55	M	Aspiration trachéale	+	[2.27 -2.35]
	17	15/06/2011	45	M	Pus	-	[1.90 -2.30]
	18	19/06/2011	54	M	Aspiration trachéale	-	[2.24 -2.31]
	19	22/06/2011	36	M	Sonde urinaire	-	[2.16 – 2.30]
	20	14/07/2011	51	M	Pus	-	[1.90 -2.30]
	21	22/07/2011	62	M	Pus	-	[2.19 – 2.30]
	22	02/08/2011	37	M	Aspiration trachéale	-	[1.9 -2.30]
	23	10/08/2011	76	M	Aspiration trachéale	-	[2.28 -2.30]
	24	27/08/2011	43	F	Sonde urinaire	-	[2.25 -2.30]
	25	10/09/2011	83	M	Aspiration trachéale	+	[1.90 -2.30]
	26	08/09/2011	59	F	Aspiration trachéale	-	[2.24 -2.30]
	27	13/09/2011	29	M	Aspiration trachéale	-	[2.23 – 2.35]
	28	20/09/2011	25	M	Aspiration trachéale	-	[1.90 -2.30]
	29	21/09/2011	78	M	Aspiration trachéale	-	[2.12 -2.34]
	30	29/09/2011	48	M	Aspiration trachéale	-	[2.28 -2.35]

M : Masculin ; F : Féminin ; - : négatif ; + : positif

A partir de la figure 5 on note, 10% des souches *A. baumannii* issues des urines de patients sondés. En effet, les sondages par voies urinaires externes sont fréquents dans la médication au niveau des services de réanimation. Ce sont des actes invasifs, traumatisants pour les muqueuses ; ce qui facilite l'infection par *A. baumannii* présent dans l'environnement immédiat du malade. Ce taux d'infection urinaire par cette bactérie est relativement faible car la bactérie qui domine dans ce type d'infection c'est *E. coli*

L'isolement à partir des plaies et par hémocultures est faible avec un pourcentage de 3.33% (Fig. 5).

De cela, il ressort que ce microorganisme est partie prenante de la bacteriocenose du service de réanimation.

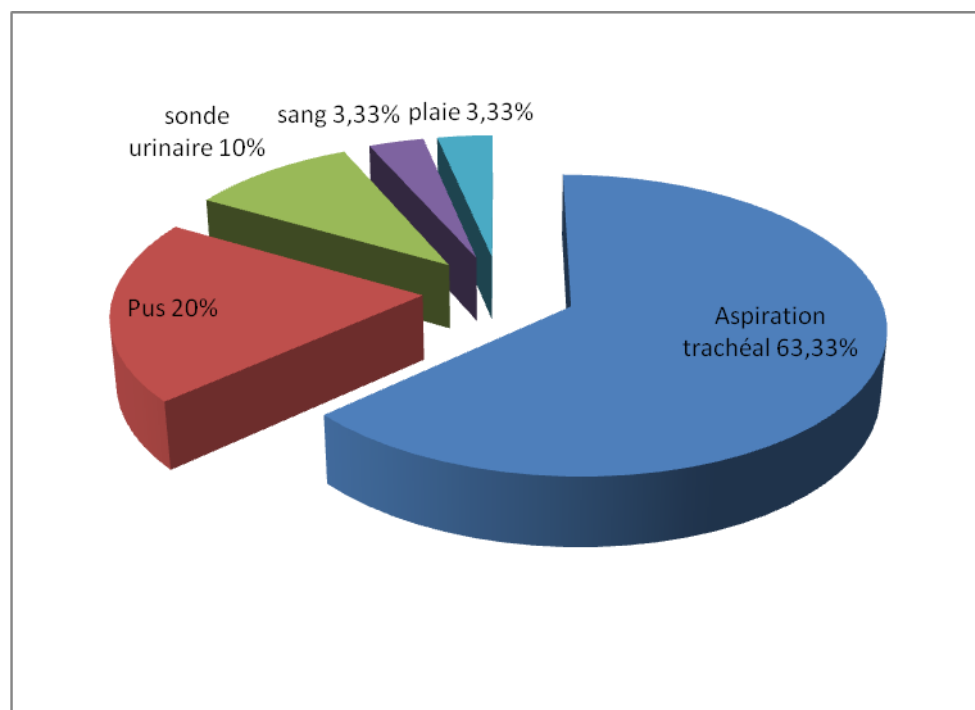


Fig. 5. Répartition des souches *A. baumannii* en fonction du type de prélèvements

A partir des résultats obtenus par MALDI TOF, un dendrogramme est réalisé on comparant les spectres obtenus avec les spectres présents dans la banque de données du MALDI TOF, cette comparaison nous permet d'avoir un aspect épidémiologique des souches qu'on veut étudier.

Le résultat du dendrogramme a révélé que nos souches d'Annaba se regroupent dans un même cluster ce qui suggère qu'on est en présence d'une petite épidémie dans le service de réanimation.

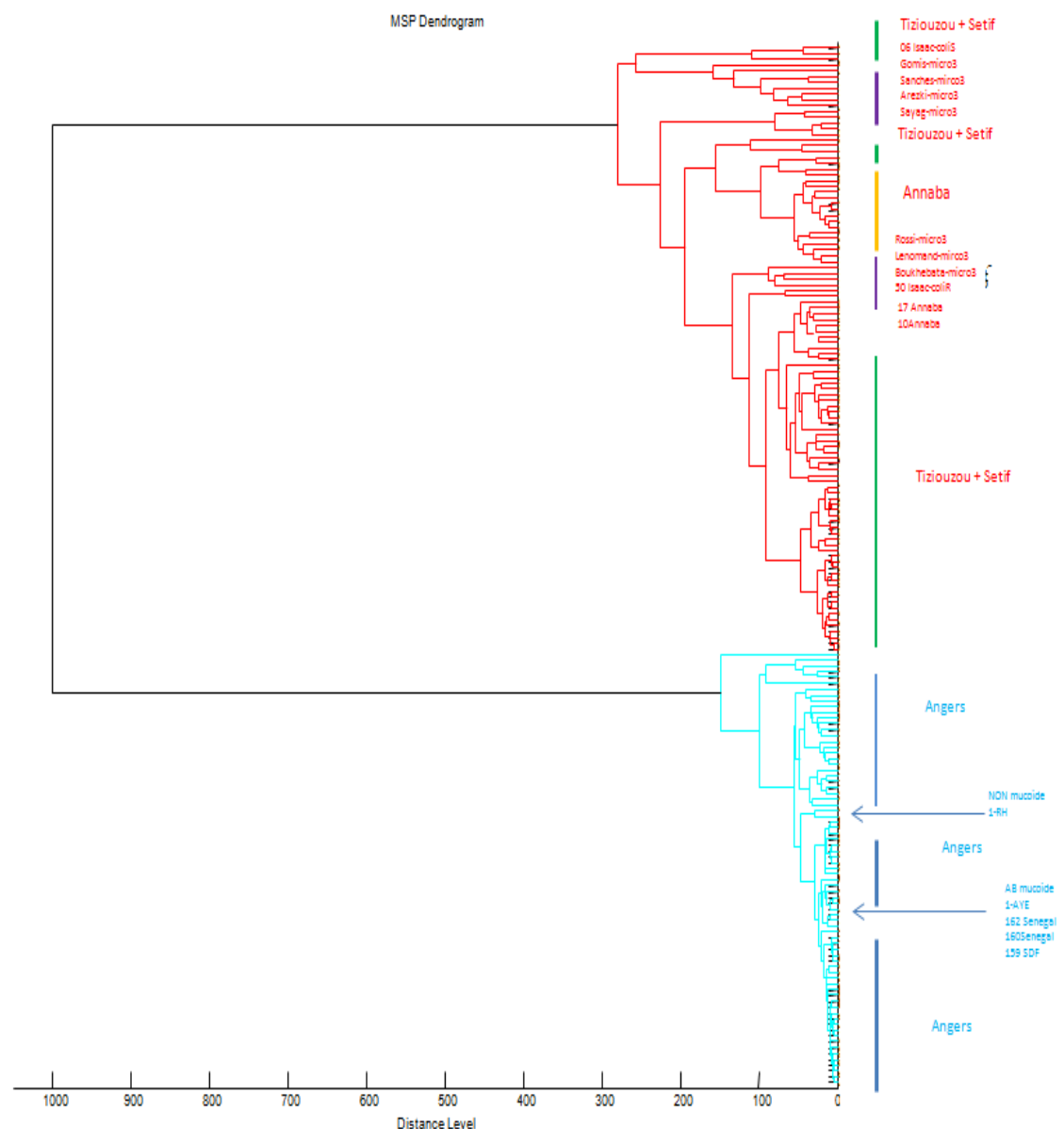


Fig.6. Dendrogramme des souches *A. baumannii* comparé aux souches de Sétif, Tizi- Ouzou et Anger.

1. Antibio-résistance des souches *Acinetobacter baumannii*

L'antibiogramme des souches *A. baumannii* (Tab. 13), montre des niveaux de résistance très élevée aux 16 antibiotiques testés, particulièrement aux β -lactamines.

Il en ressort une résistance totale aux Fluoroquinolones et aux β -lactamines des groupes cephèmes (céphalosporine de 3^{ème} génération), pénames, monobactames et une résistance de 80% à l'imipénème du groupe des carbapénèmes.

Après les résistances aux β -lactamines, la résistance aux aminosides est en moyenne de 71.6%, et à la Rifampicine est de 30%.

Le E-test donne des CMI de la colistine variant de 0.25 à 0.50 mg/L, on est alors en présence de souches sensibles à cet antibiotique.

Tab. 13. Profil de résistance aux antibiotiques des souches *Acinetobacter baumannii* isolées

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Charge	% R
Béta-lactamines	Ceftazidime (CAZ)	30	100%
	Ticarcilline+acide Clavulanique(TCC)	75/10	100%
	Aztréonam (ATM)	30	100%
	Ticarcilline (TIC)	75	100%
	Pipéracilline (PRL)	75	100%
	Imipénème (IMP)	10	80%
	Pipéracilline + Tazobactam (TZP)	110	100%
	Cefsulodine (CFS)	30	100%
	Ceftriaxone (CRO)	30	100%
Aminoside	Amikacine (AK)	30	66.6%
	Néomycine (N)	30	60%
	Gentamycine (CN)	15	70%
Fluoro-quinolone	Ciprofloxacin (CIP)	5	100%
Polymyxine	Colistine (CT)	50	0%
Fosfomycine	Fosfomycine (FOS)	50	91,7%
Rifampicine	Rifampicine (RA)	30	30%

% : pourcentage ; R : résistance

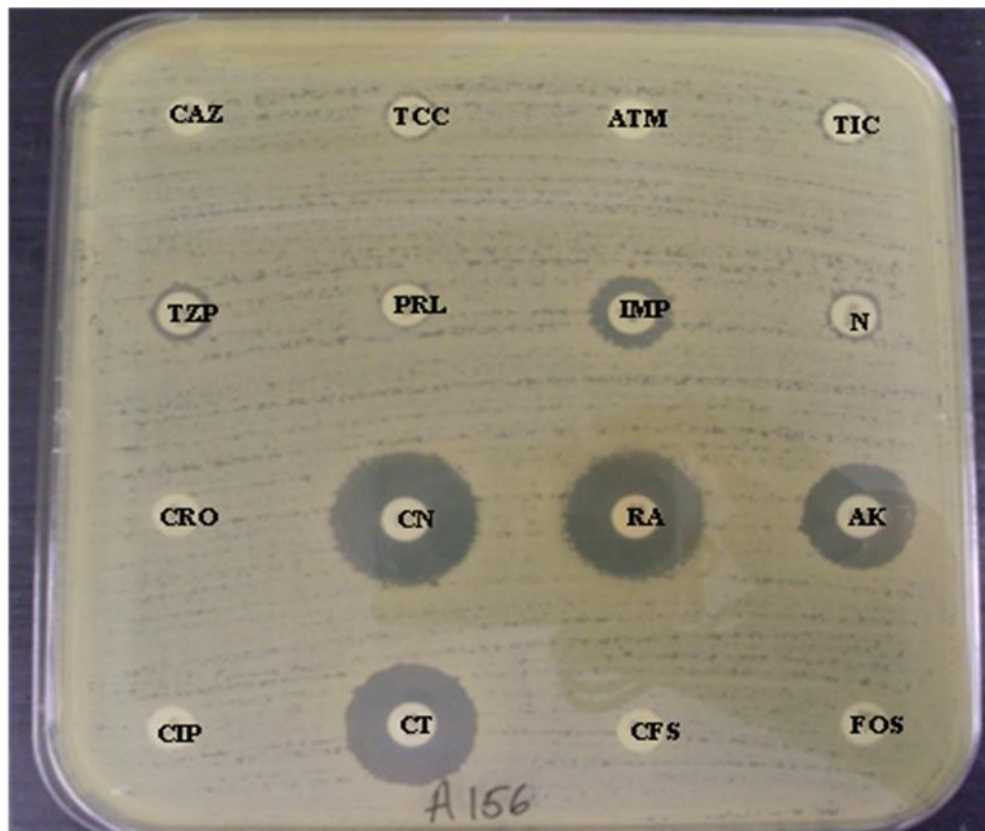


Fig. 6. Antibiogramme d'une souche *A. baumannii* possédant le gène *bla*_{OXA-23}

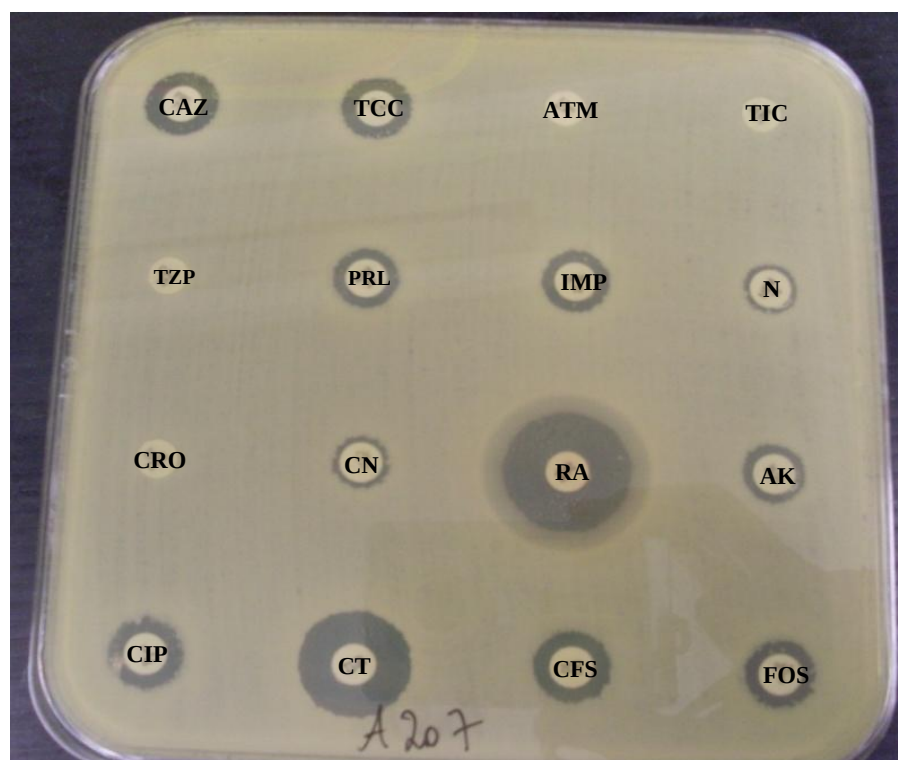


Fig. 7. Antibiogramme d'une souche *A. baumannii* possédant le gène *bla*_{OXA-58}

2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

Les valeurs absolues des CMI de l'imipénème des 24 souches *A. baumannii* résistantes oscillent dans un intervalle allant de 12mg/L à plus de 32 mg/L. Ce sont des niveaux très élevés de résistance. Par ailleurs, ces mêmes souches, sont aussi résistantes aux Fluoroquinolones et aux aminosides. Nous pouvons sans doute parler de souches, non seulement multi-résistantes mais de hauts niveaux de résistance.

Les CMI des 9 souches *A. baumannii*, qui sont résistantes à la rifampicine varient de 12 à > 32 mg/L. Ces mêmes souches sont résistantes à l'imipénème.

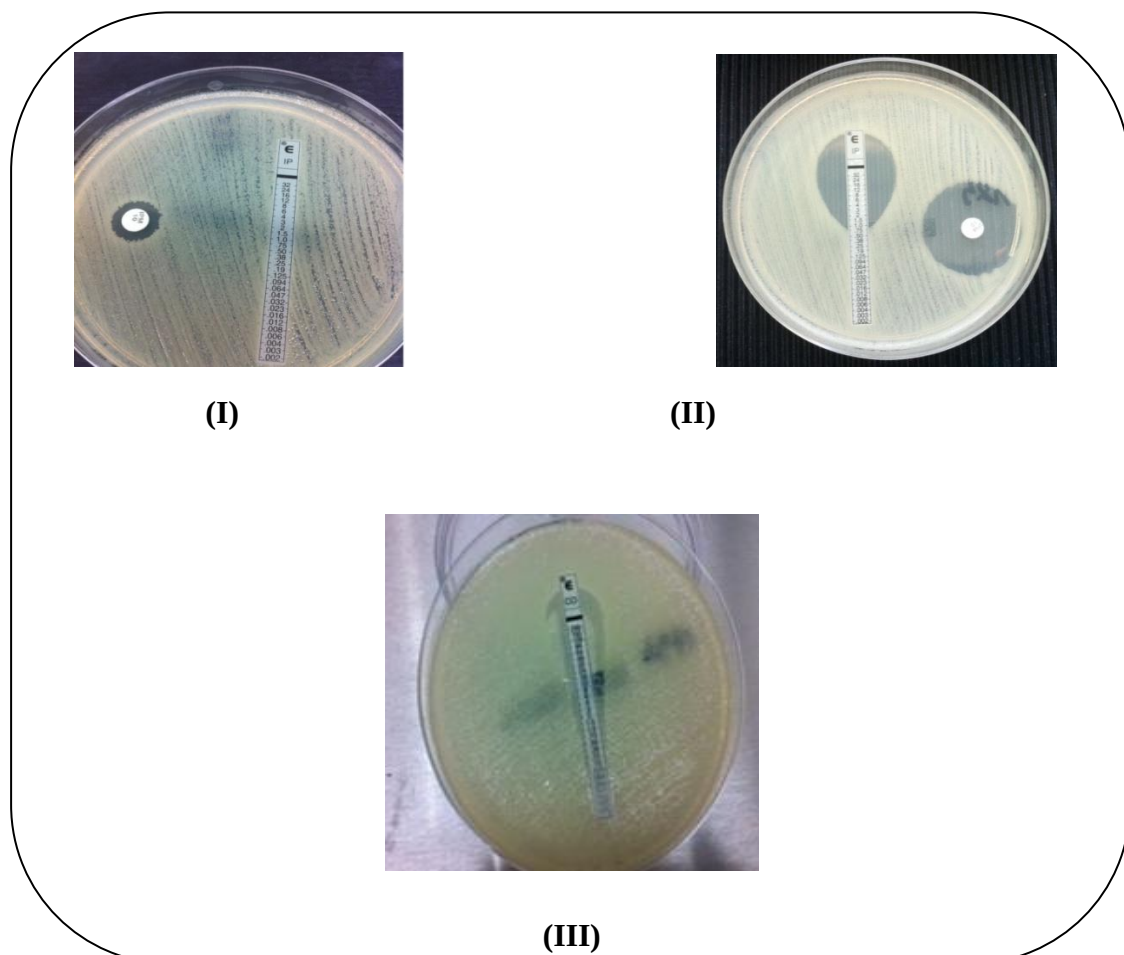


Fig. 8. CMI par E-test imipénème. **(I).** E-test imipénème souche *A. baumannii* résistante. **(II)** E-test imipénème souche *A.baumannii* sensible. **(III)** E-test colistine souche *A.baumannii* sensible

3. Recherche phénotypique des carbapénèmases

3.1. Test MALDI TOF ultraflex

Dans notre étude, parmi les 30 souches de *A. baumannii*, 24 sont résistantes à l'imipénème avec une concentration minimal inhibitrice (CMI) qui varie entre 12 à > 32 mg/L (Figure 4).

Les 24 souches résistantes à l'imipénème ont été testées pour la détection des carbapénèmase par MALDI-TOF ultraflex. Pour valider ce test de détection des carbapénèmases, deux souches de référence ont été utilisées comme témoins : *Escherichia coli* ATCC 25922 comme témoin négatif et *Klebsiella pneumoniae* (« Kpnasey » souche de référence pour NDM-1) comme témoin positif.

Les résultats de l'ultraflex des 24 souches de *A. baumannii* résistantes à l'imipénème montre que le pic spécifique de l'imipénème à 300 m/z disparaît complètement au cours de la période d'incubation de 4 heures avec visualisation du pic spécifique du métabolite à 254m/z. Il ya eu donc une dégradation totale de cet antibiotique, ce qui révèle la présence d'une carbapénèmase chez les 24 souches. Ce résultat est confirmé par le calcul du ratio qui est < 0.5. (fig.9).

En ce qui concerne les six souches de *A. baumannii* sensible à l'imipénème, le résultat de l'ultraflex révèle la présence du pic spécifique de l'imipénème à 300m/z, au cours de la période d'incubation de 4 heures avec un Ratio > 0.5. Ce qui montre l'absence d'une carbapénèmase. (fig.8).

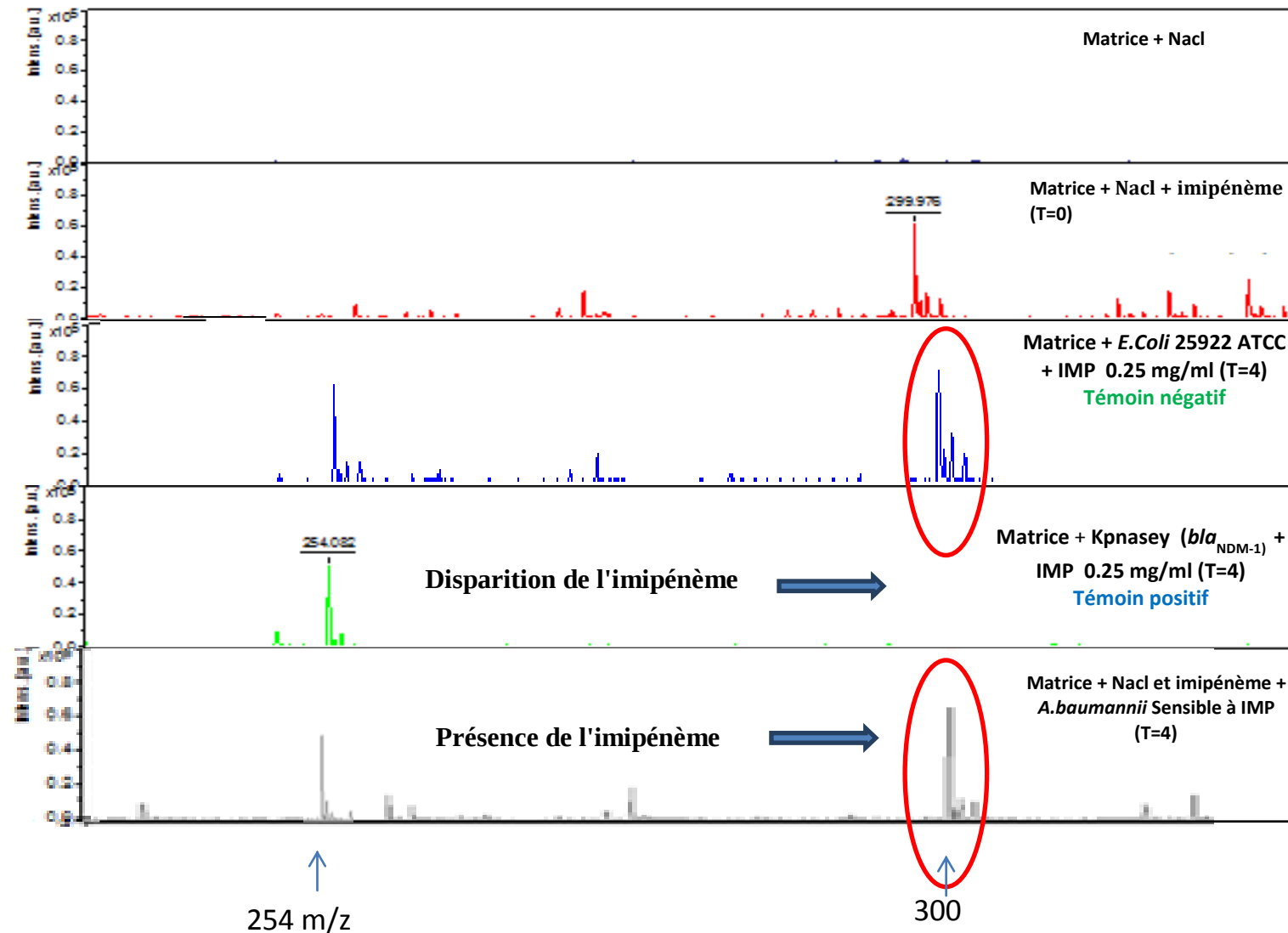


Fig. 9. Hydrolyse de l'imipénème par Spectre de masse MALDI TOF Ultraflex d'une souche *A. baumannii* sensible aux carbapénèmes. On a utilisées: *E. coli* ATCC 25922 comme témoin négatif et Kpnasey de référence pour NDM-1) comme témoin positif. Après une incubation à 37°C pendant 4 heure avec une concentration de imipénème à 0,25 mg / ml; NaCl 0,45%. Les unités de l'axe ordonnée représentent la masse par charge en Daltons [m / z (Da)] et celles de L'axe des abscisses représentent une intensité relative (unités arbitraires).

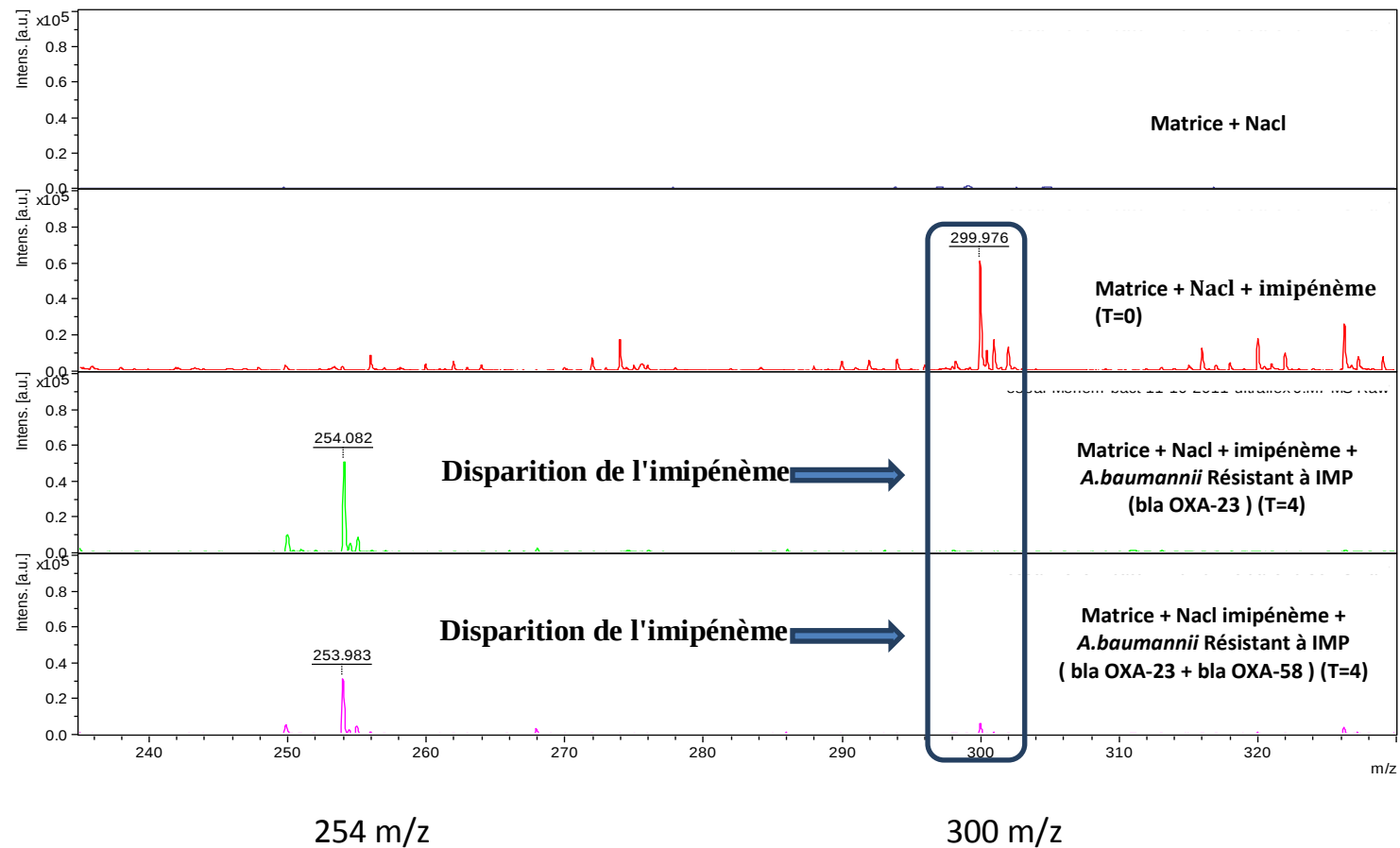


Fig. 10. Hydrolyse de l'imipénème par Spectres de masse MALDI TOF Ultraflex de deux souches *A. baumannii* résistante aux carbapénèmes (l'une possède le gène *bla*_{OXA-23} et l'autre contient deux gènes codant une carbapénémase *bla*_{OXA-23} et *bla*_{OXA-58}. Après une incubation à 37°C pendant 4 heure avec une concentration de imipénème à 0,25 mg / ml; NaCl 0,45%. Les unités de l'axe ordonnée (représentent la masse par charge en Daltons [m/z (Da)] et celles de L'axe des abscisses représentent une intensité relative (unités arbitraires).

3.2. Test de Hodge

Parmi les 30 souches de *A. baumannii* isolées, 24 sont résistantes à l'imipénème avec une MIC ≥ 12 mg/L et positives au test de Hodge ce qui suggère une production de carbapénémase (Fig. 10). Le test de Hodge est positif lorsque la déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à tous les antibiotiques) indique la présence d'une carbapénémase.

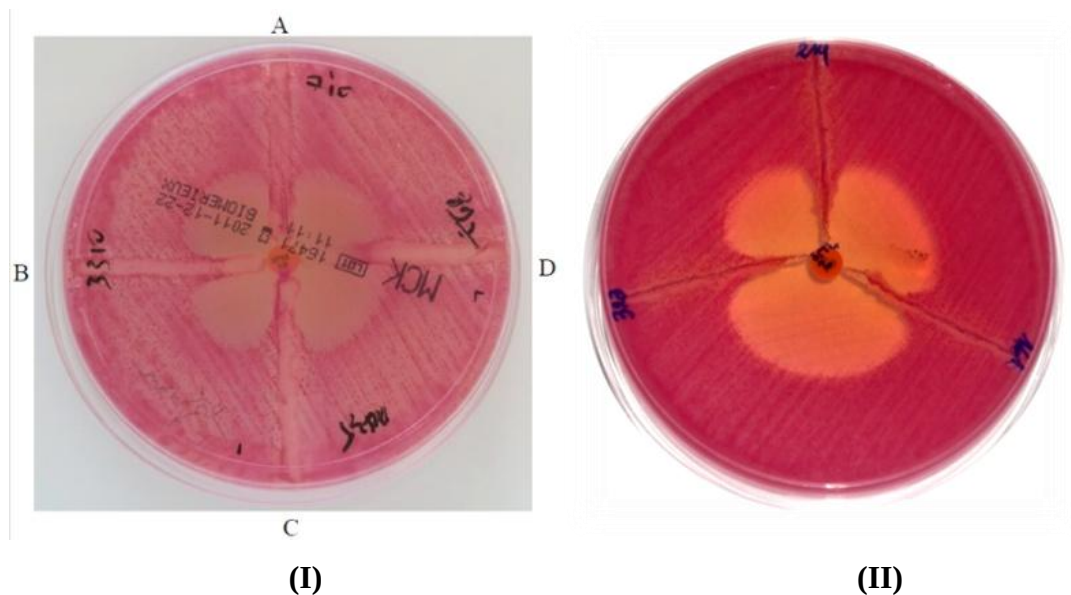


Fig. 11. (I). Test de Hodge. Le test est basé sur l'inactivation d'une Carbapénème par un organisme producteur de carbapénémase, qui permet à une souche indicatrice sensible aux carbapénèmes de croître à proximité d'un disque de carbapénèmes. Résultats de ce test représentant trois souches *A. baumannii* (A), (B), (C) résistantes à l'imipénème et une souche *A. baumannii* (D) sensible à l'imipénème (Témoin négatif). **(II)** Tests de Hodge positifs pour trois souches *A. baumannii* résistantes à l'imipénème → production d'une carbapénémase.

4. Détermination des supports génétiques de la résistance

4.1. Détection moléculaire des gènes codant pour des carbapénèmases

4.1.1. Par PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une technique rapide et efficace qui nous permet le dépistage de gènes codant pour les carbapénèmase. Le résultat des produits de la PCR nous montre que sur les 24 souches de *A. baumannii* résistantes à l'imipénème, 23 possèdent le gène *bla*_{OXA-23} codant pour une carbapénèmase. Parmi ces 23 souches, une contient deux gènes codant pour une carbapénèmase *bla*_{OXA-23} et *bla*_{OXA-58}. Enfin, la 24^{ième} souche possède le gène *bla*_{OXA-58} qui code pour une carbapénèmase.

Les 24 souches *A. baumannii* résistantes à l'imipénème possèdent tous les gènes *bla*_{OXA-51}, mais aucune souche ne possède *bla*_{NDM-1} et *bla*_{KPC}.

4.1.2. Par PCR standard

Après une électrophorèse sur gel d'agarose, les résultats de la PCR standard des gènes codant pour des carbapénèmase, confirme les résultats obtenus par PCR en temps réel et montre que :

- Sur les 24 souches de *A. baumannii* résistantes à l'imipénème, 23 souches possèdent le gène *bla*_{OXA-23}, dont l'une contient aussi le gène *bla*_{OXA-58}. (Fig.12, 13).
- Une souche possède uniquement le gène *bla*_{OXA-58}.
- Les 24 souches de *A. baumannii* sont positives à *bla*_{OXA-51} et *ISAba1* (Fig. 11).
- Aucune souche ne possède les gènes : *bla*_{OXA-24}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} et *bla*_{KPC}

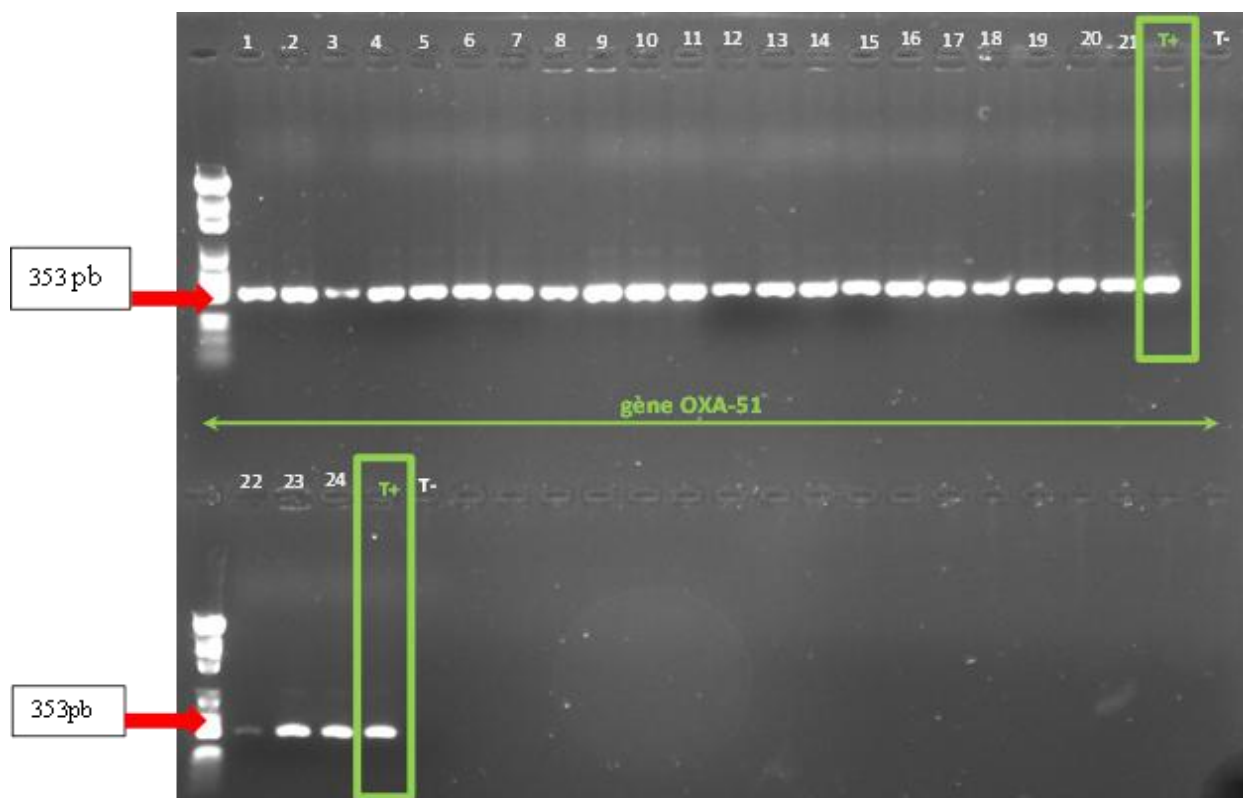


Fig. 12. Amplification du gène *bla*_{OXA-51} des 24 souches de *A. baumannii* résistantes à l'imipénème par PCR

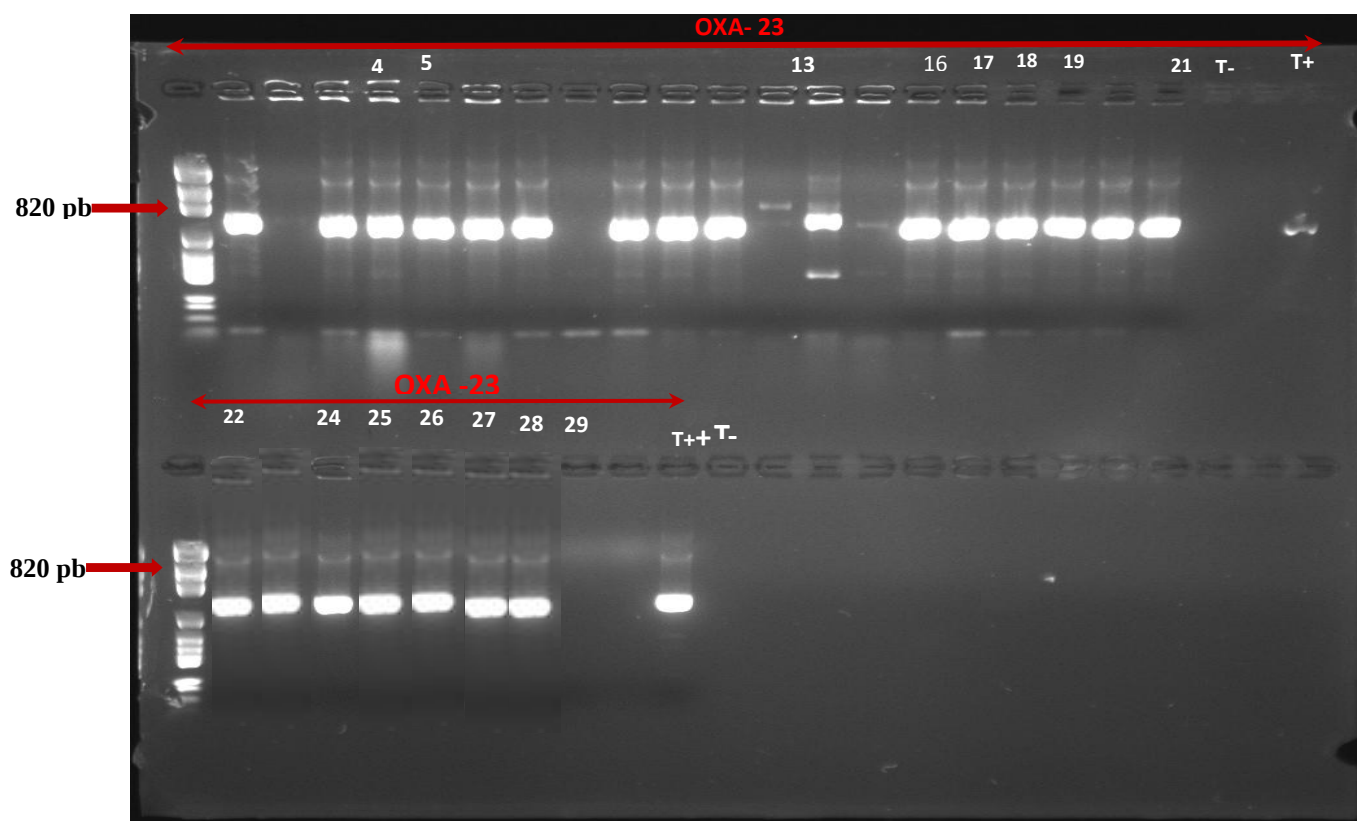


Fig. 13. Amplification du gène *bla*_{OXA-23} par Polymerase Chain Reaction (PCR) des 30 souches de *A.baumannii* isolées

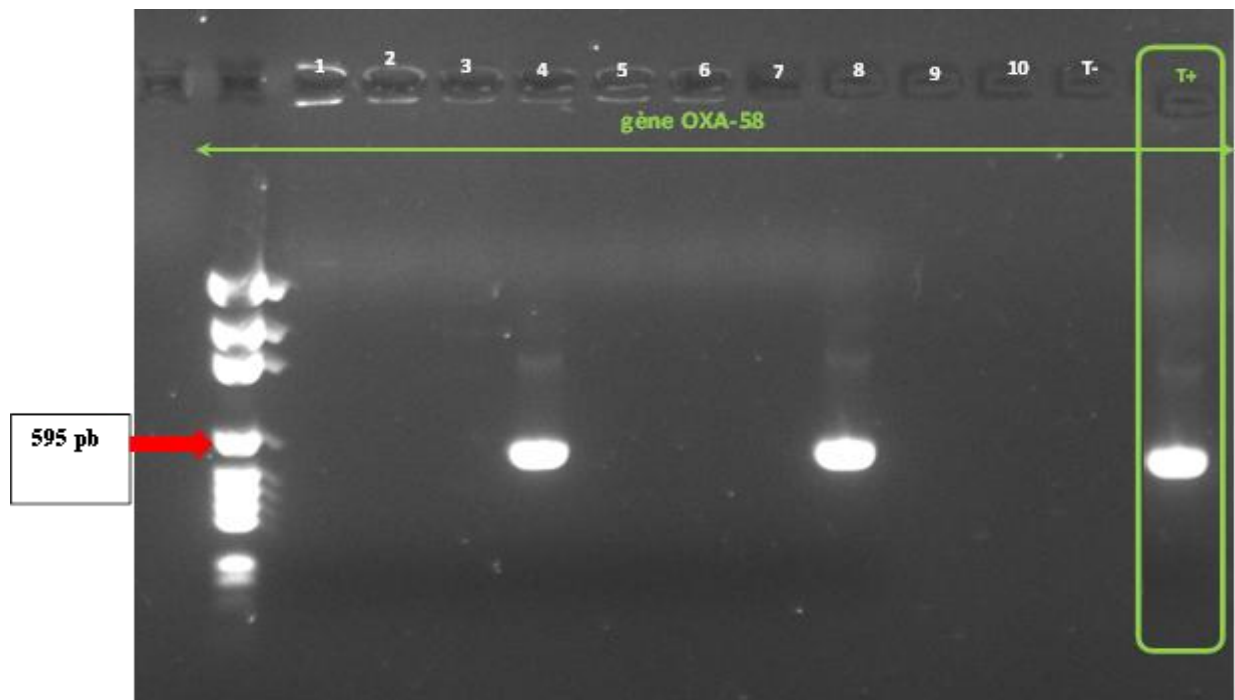


Fig. 14. Amplification du gène *bla*_{OXA-58} par Polymerase Chain Reaction (PCR) des 24 souches de *A. baumannii* résistantes à l'imipénème

4.2. Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre étendu

Au cours de notre travail, les résultats de l'amplification des *BLSE* du gène *bla*_{TEM-128} par PCR standard a montré que sur les 30 souches de *A. baumannii*, seulement 13 se sont avérées positives (fig. 14).

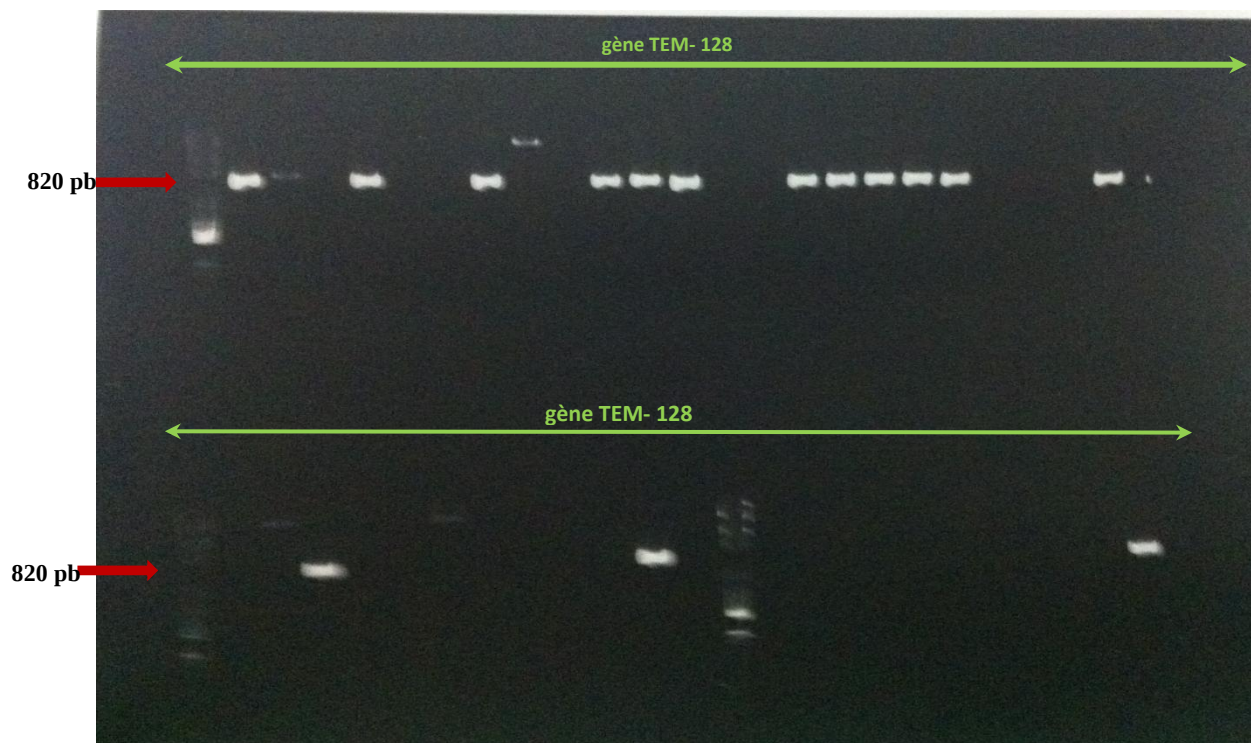


Fig. 15. Amplification du gène *bla*_{TEM-128} par PCR des 30 souches de *A. baumannii*

Aucune souche ne possède une β -lactamase de classe A d'Ambler ; *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}.

4.3. Recherche moléculaire de la résistance associée

Les résultats de la PCR standard ne laisse apparaitre de gène *arr-6* (pour rifampicine), ni les gènes *qnrA* et *qnrB* (pour les quinolones), ni les gènes *aadB* et *aacA4* (pour les aminosides).

5. Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés

L'analyse des séquences nucléotidiques des produits de PCR purifiés du gène *bla_{OXA-23}* retrouvés chez les 23 souches de *A. baumannii*, avec une taille du produit PCR 870pb, montre qu'elles sont 100% identiques à celle du gène ayant un numéro d'accès GenBank HQ700358.

Les séquences positives obtenues à partir du gène *bla_{OXA-58}* avec une taille du produit PCR 602pb sont 100% similaire au gène dont le numéro d'accès GenBank est HQ219687.

En ce qui concerne le résultat du séquençage des 13 souches positives par PCR standard du gène *bla_{TEM-128}*, le blast a montré que les séquences sont 100% identiques à celle qui porte le numéro d'accès GenBank n°AY359287.1

6. Recherche de la localisation génétique des gènes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-58}* et *bla_{OXA-51}* en association avec la séquence d'insertion (IS)

Au cours de notre travail, nous avons constaté que *ISAbal* est en aval (downstream) aux 18 souches *A. baumannii* du gène *bla_{OXA-23}*, [Fig. 15 (A)], 100% identiques au numéro d'accès GenBank n° FJ959346.1. Il se trouve également en amont à 14 souches *A. baumannii* de *bla_{OXA-51}*, [Fig. 15 (B)], avec un numéro d'accès GenBank n°HQ67466.1.

En ce qui concerne la séquence d'insertion, *ISAbal* se trouve en amont (upstream) pour les deux souches de *A. baumannii* *bla_{OXA-58}* [Fig. 15 (C)]: l'une de ces souches possède uniquement le gène *bla_{OXA-58}*, 100% identique au numéro d'accès GenBank n°GUO64936.1 et l'autre contient *ISAbal* en aval *bla_{OXA-23}*. (Fig. 16).

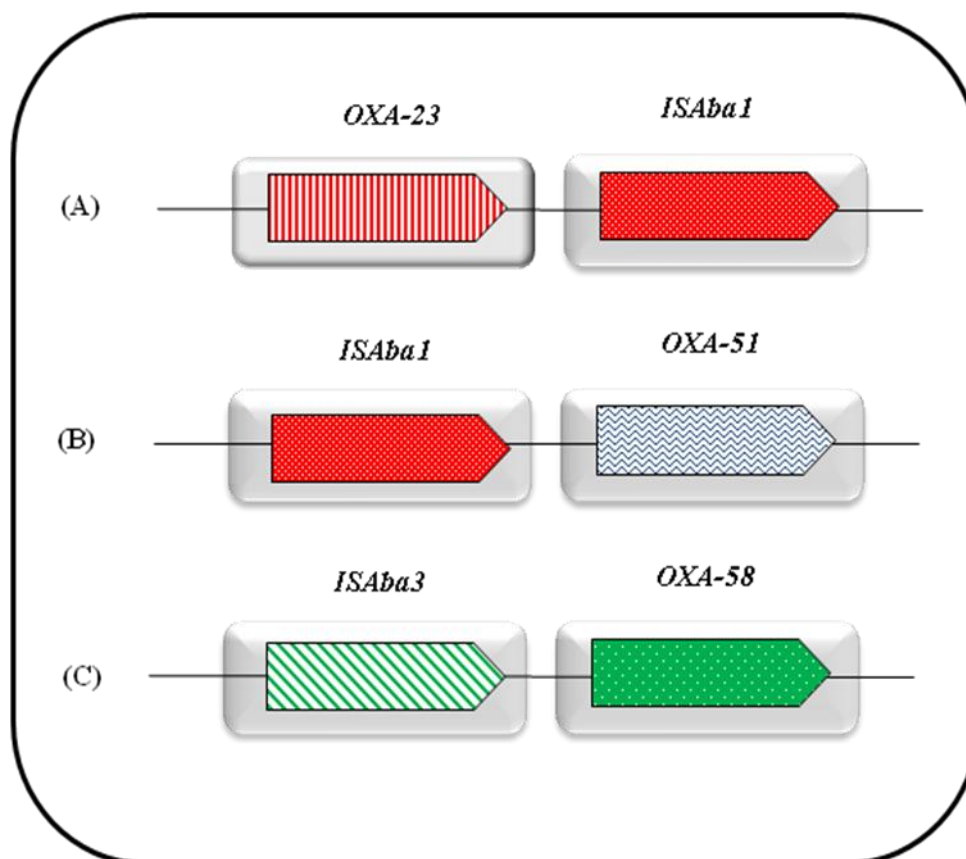


Fig. 16. Localisation génétique avec la séquence d'insertion (IS) par rapport aux gènes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} et *bla*_{OXA-51}. **(A)** : *ISAbal* est en aval aux 18 souches *A. baumannii* du gène *bla*_{OXA-23}. **(B)** : *ISAbal* en amont à 14 souches *A. baumannii* de *bla*_{OXA-51}. **(C)** : *ISAbal3* se trouve en amont des deux souches *A. baumannii*

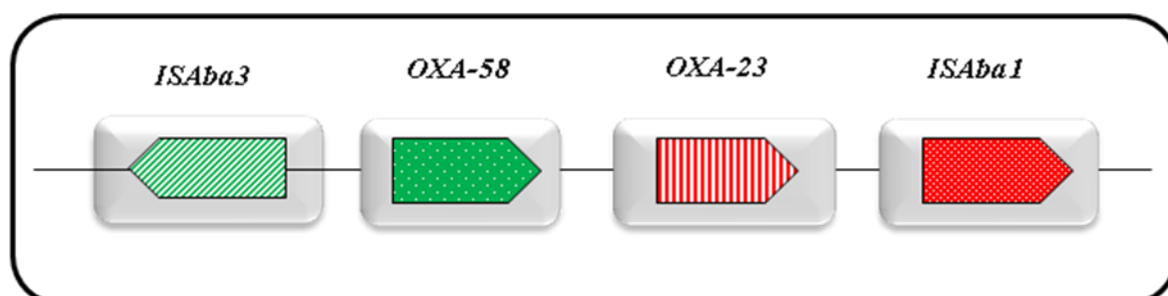


Fig. 17. *ISAbal3* se trouve en amont d'une souche *A. baumannii* et contient également *ISAbal* en aval *bla*_{OXA-23}

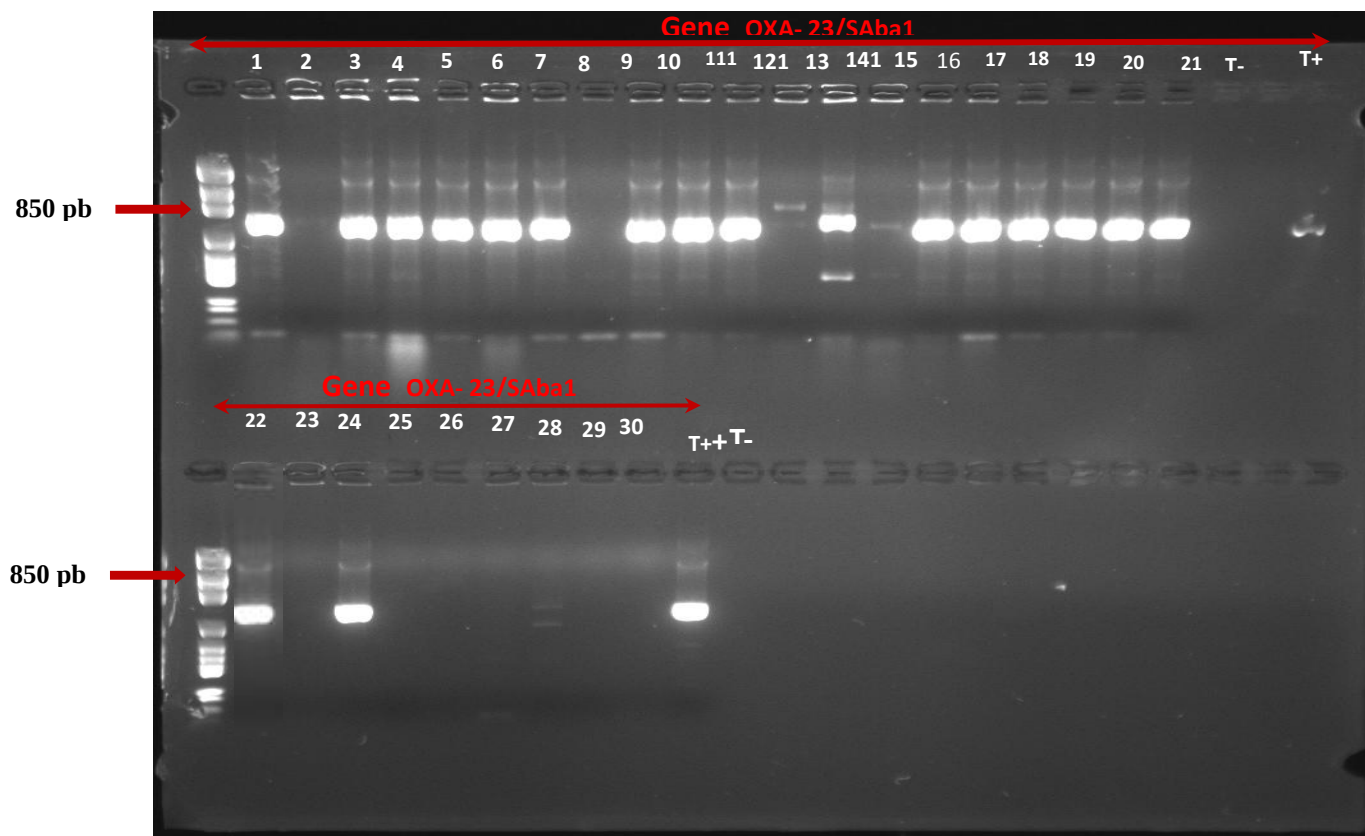


Fig. 18. Amplification du gène OXA-23/ISAba1 par PCR des souches 30 *A. baumannii*

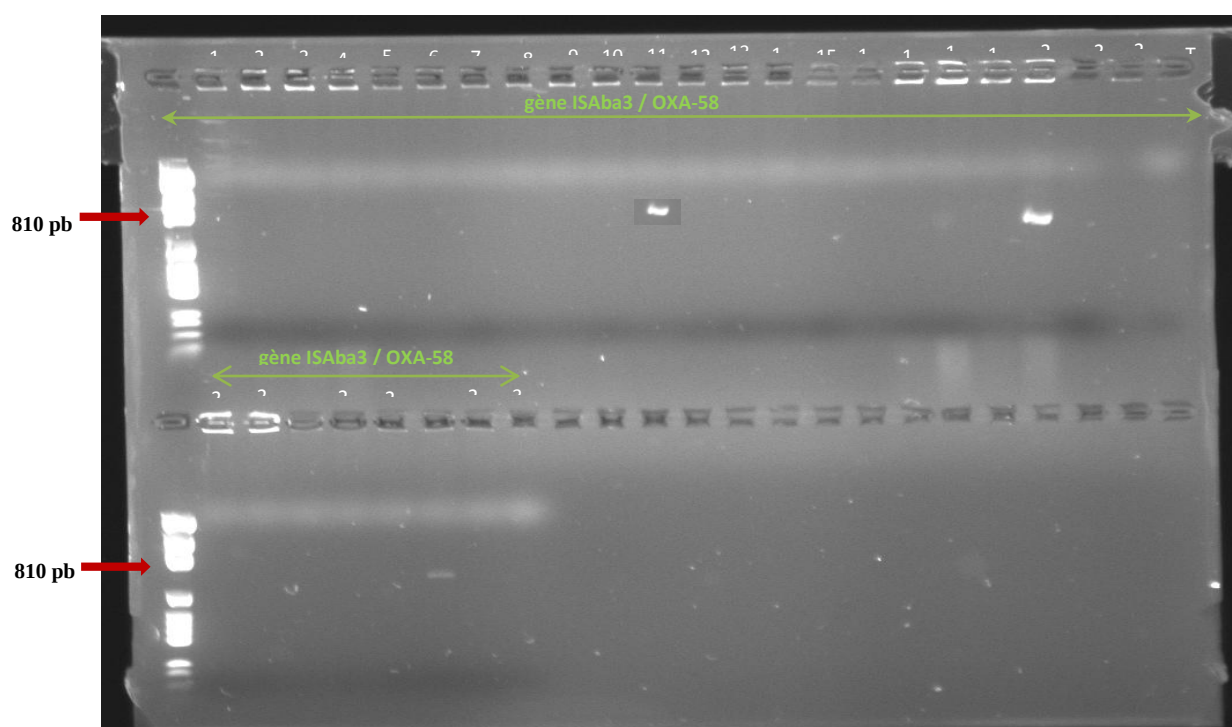


Fig. 19. Amplification du gène ISAba3/OXA-58 par PCR des 30 souches de *A. baumannii*

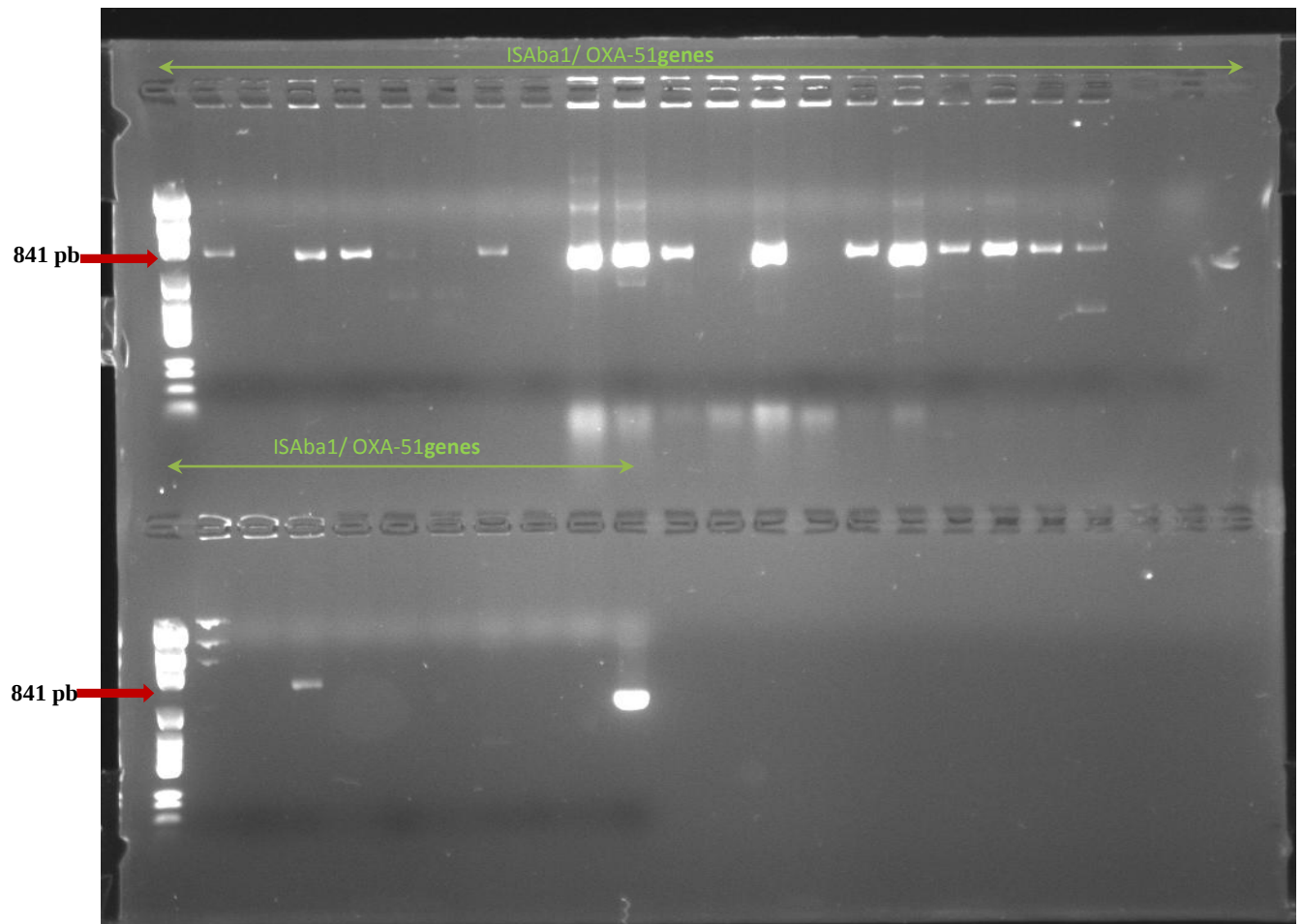


Fig. 20. Amplification du gène *ISAbal/OXA-51* par Polymerase Chain Reaction (PCR) des 30 souches *A. baumannii*

7. Génotypage recA des *A. baumannii*

Durant ce travail, les 30 souches de *A. baumannii* ont été isolées au niveau de deux unités de soins intensifs (Adultes et enfants) à l'hôpital universitaire d'Annaba- Algérie.

Après une amplification du gène recA par PCR qui est ensuite séquencé et analysé, corrigé par le logiciel codan code Aligner. Ces séquences sont alignées avec le logiciel Clustal X (Fig. 21). Et ensuite, on construit un arbre phylogénétique grâce au logiciel Mega version 4.

Les résultats nous montrent huit génotypes de ces souches de *A. baumannii*, les génotypes recA-27 ont été retrouvés chez les 15 souches isolées de l'unité de soins intensifs pour adultes, les génotypes recA-2/9/22/25/29/62 ont été trouvés chez les souches 5 de patients adultes, et le génotype recA-11/6 / 8 ont été décelés chez les 3 souches isolées de l'unité de soins intensifs des enfants. (Fig. 20).

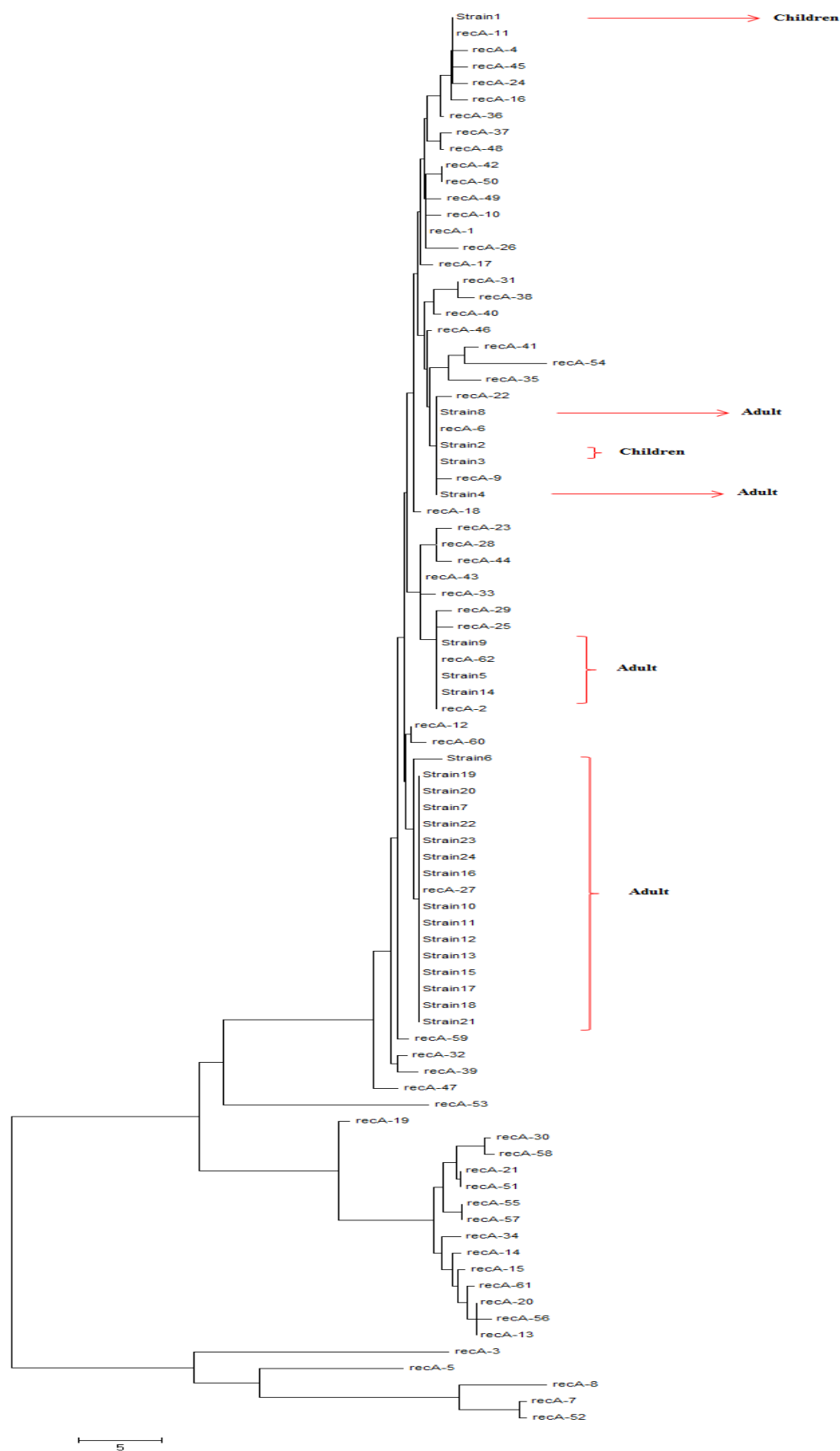


Fig. 21. Génotypage rec. A des 30 souches de *A. baumannii* isolées au niveau des services de réanimation



Fig. 22. Alignements avec le logiciel Clustal X des 30 souches de *A. baumannii* isolées au niveau des services de réanimation

Pseudomonas aeruginosa

Cette étude prospective nous a permis l'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF- MS (Microflex) un total de trente-quatre *Pseudomonas aeruginosa* isolés au niveau des services de réanimation du CHU de Annaba – Algérie, avec un très bon score de 1.9 et 2.3. Cette identification a été confirmée par la méthode API20-NE (BioMérieux, Meylan, France) (Tab. 14) (fig. 22).

Parmi les 34 patients hospitalisés en réanimation, trois sont décédés (8.82%). Les 34 souches *P. aeruginosa* sont représentées dans le tableau 14.

Ces souches ont été isolées à partir de divers prélèvements, dont l'aspiration trachéale domine avec un nombre de 15 prélèvements.

La pose de sonde urinaire est un acte invasif, les patients s'infectent lors de cette manipulation agressive, occasionnant des lésions de la muqueuse qui facilite une surinfection par *P. aeruginosa* qui survient de l'environnement hospitalier.

D'autre part, cinq souches de ce genre ont été isolées de pus divers, et quatre souches, sur des prélèvements de plaies. Dans ces cas, l'infection était poly-microbienne où *Staphylococcus* et *A. baumannii* peuvent s'associer à *P. aeruginosa*.

Les hémocultures et les examens d'urine sont peu fréquents dans notre étude. Ils sont au nombre de deux cas pour chacun.

Tab.14. Récapitulatifs des 34 souches *P. aeruginosa* isolées et leurs score du MALDI-TOF

<i>P. aeruginosa</i>	Date du prélèvement	Age	Sexe	source Isolation	Nombre de mort	Score MALDI
1	22/11/2010	39	F	Pus	-	[2.3 – 2.2]
2	22/11/2010	50	M	Pus	-	[1.9 – 2.0]
3	15/12/2010	42	M	Aspiration trachéale	-	[1.9 – 2.3]
4	15/12/2010	41	F	Sang	-	[2.0 – 2.1]
5	28/12/2010	64	M	Aspiration trachéale	-	[1.9 – 2.3]
6	28/12/2010	35	F	Aspiration trachéale	-	[1.9 -2.3]
7	24/02/2011	59	M	Pus	+	[2.0 – 2.3]
8	24/02/2011	38	F	Aspiration trachéale	+	[1.9 – 2.2]
9	25/02/2011	44	M	Aspiration trachéale	-	[2.0 – 2.3]
10	25/02/2011	18	F	Aspiration trachéale	+	[1.9 – 2.3]
11	27/02/2011	7	M	Aspiration trachéale	-	[1.9 -2.3]
12	27/02/2011	34	F	Aspiration trachéale	-	[2.2 – 2.3]
13	08/03/2011	73	M	Aspiration trachéale	-	[1.9 – 2.0]
14	15/03/2011	27	F	Urine	-	[2.0 – 2.3]
15	22/03/2011	57	M	Sonde urinaire	-	[2.0 – 2.3]
16	23/03/2011	43	F	Sonde urinaire	-	[2.2 -2.3]
17	23/03/2011	43	M	Sonde urinaire	-	[1.9 -2.3]
18	15/04/2011	71	M	Sonde urinaire	-	[2.0 -2.3]
19	18/04/2011	35	M	Urine	-	[2.1 – 2.3]
20	16/05/2011	12	M	Aspiration trachéale	-	[1.9 -2.3]
21	20/05/2011	51	M	Plaie	-	[2.1 – 2.3]
22	25/05/2011	7	M	Pus	-	[1.9 -2.0]
23	15/06/2011	73	F	Aspiration trachéale	-	[2.1 -2.3]
24	19/06/2011	46	M	Sonde urinaire	-	[2.2 -2.3]
25	22/06/2011	32	M	Sang	+	[1.9 -2.3]
26	22/06/2011	58	F	Aspiration trachéale	-	[2.2 -2.3]
27	14/07/2011	54	F	Aspiration trachéale	-	[2.1 – 2.3]
28	22/07/2011	40	M	Aspiration trachéale	-	[1.9 -2.3]
29	10/08/2011	49	M	Aspiration trachéale	-	[2.2 -2.3]
30	18/08/2011	54	M	Plaie	-	[2.1 -2.2]
31	27/08/2011	45	M	Plaie	-	[1.9 -2.3]
32	10/09/2011	10	M	Sonde urinaire	-	[2.0 -2.2]
33	27/08/2011	45	M	Plaie	-	[2.1 -2.3]
34	10/09/2011	54	M	Pus	-	[1.9 -2.2]

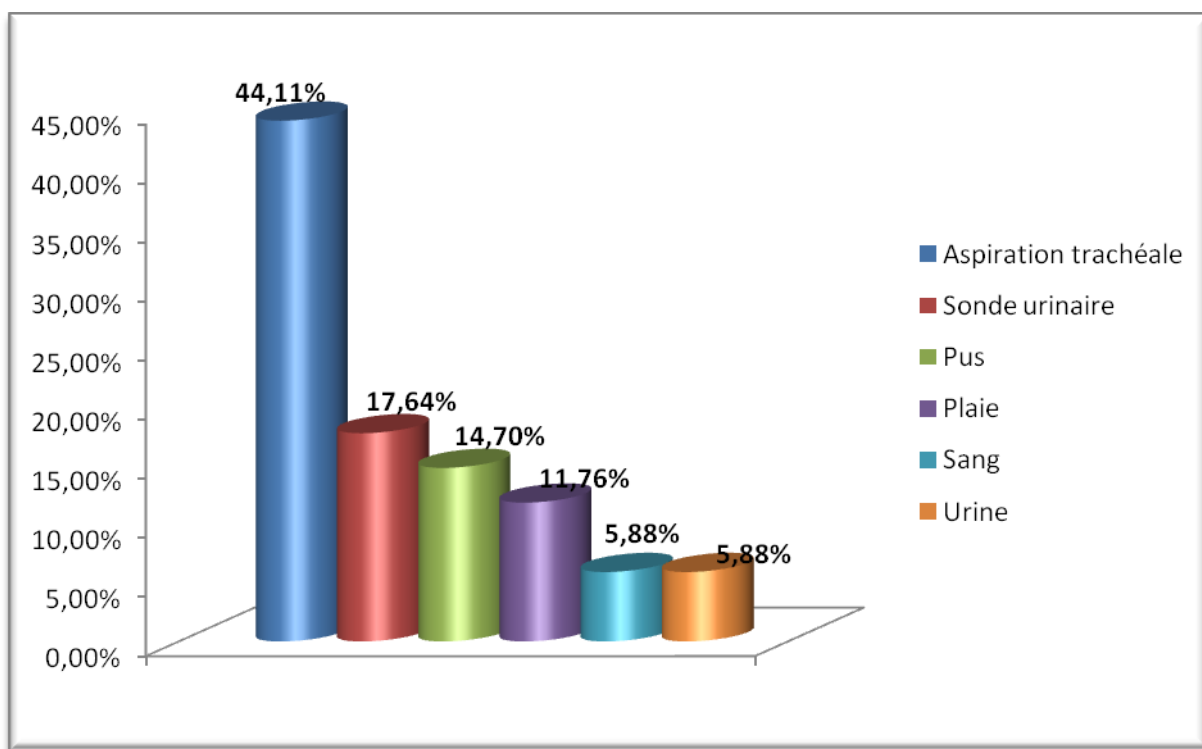


Fig. 23. Répartition des souches selon l'origine des prélèvements

1. Antibio-résistance des souches *P. aeruginosa*

L'antibiogramme des 34 *P. aeruginosa* (Tab. 15), (Fig. 23, 24) montre une résistance très élevées aux 16 antibiotiques testés, particulièrement aux β -lactamines.

Parmi les résistances les plus élevées aux β -lactamines, on note le groupe des carbapénèmes avec une résistance à l'imipénème de 50% (ce qui représente la moitié des échantillons), suivi par le groupe des cephèmes avec une résistance à Cefsulodine de 44.11%, le groupe des pénames avec une résistance qui varie de 16 à 33%. La résistance la plus faible est le groupe de monobactame avec 3.3%.

Après la résistance aux β -lactamines, vient la résistance aux Aminosides avec une résistance qui varie de 6.6 à 30%. Pour les fluoroquinolones, la résistance est de 20% et pour Rifampycine, elle est de 34.29%.

Devant ces résistances élevées aux β -lactamines et particulièrement à l'imipénème qui est l'un des antibiotiques de choix en réanimation, il nous est apparu essentiel de rechercher les gènes codant pour les résistances à l'imipénème.

Tab. 15. Profil de résistance des 34 souches de *P. aeruginosa* isolées

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Charge du disque	% R
Bêta-lactamine	Ceftazidime (CAZ)	30	16.6%
	Ticarcilline+acide clavulanique(TCC)	75/10	20%
	Aztréonam (ATM)	30	3.3%
	Ticarcilline (TIC)	75	20%
	Pipéracilline (PRL)	75	16.6%
	Imipénème (IMP)	10	50%
	pipéracilline + Tazobactam (TZP)	110	33.3%
	Cefsulodine (CFS)	30	44.11%
	Ceftriaxone (CRO)	30	23.52%
Aminoside	Amikacine (AK)	30	0%
	Néomycine (N)	30	6.6%
	Gentamycine (CN)	15	30%
Fluoro-quinolone	Ciprofloxacine (CIP)	5	20%
Polymyxine	Colistine (CT)	50	0%
Fosfomycine	Fosfomycine (FOS)	50	56.6%
Rifampycine	Rifampycine (RA)	30	32.35%

% : pourcentage ; R : résistance



Fig.24. Antibiogramme d'une souche de *P. aeruginosa* possédant le gène *bla*_{VIM-2}



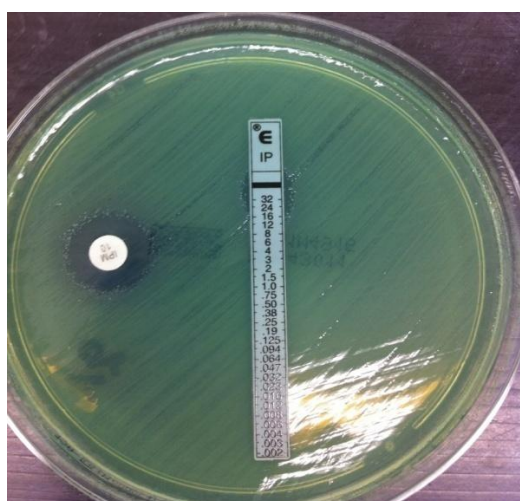
Fig. 25. Antibiogramme d'une souche de *P. aeruginosa* qui a une mutation de la porine *OprD*₂

2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

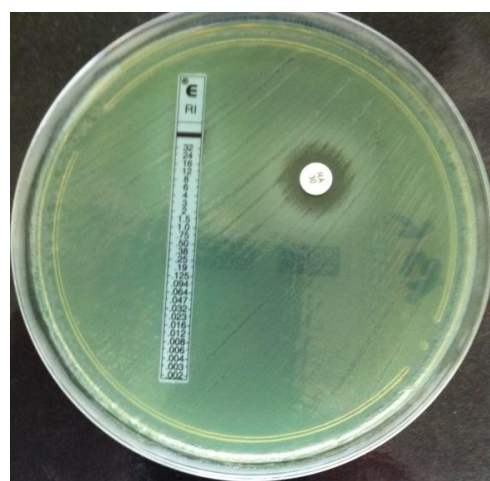
Les Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'imipénème des 17 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème, montrent des CMI qui varient de 12mg/L à plus de 32 mg/L. (fig. 25). Ce sont des niveaux très élevés de résistance. Par ailleurs, quelque, unes de ces souches, révèlent aussi des résistantes aux Fluoroquinolones et aux aminosides.

Les CMI des 11 souches *P. aeruginosa*, résistantes à la rifampicine sont supérieures à 32 mg/L. C'est même souches sont résistantes à l'imipénème (fig. 25).

A partir de ces résultats, nous pouvons parler de souches, multi-résistantes.



(I)



(II)

Fig. 26. Concentrations minimales inhibitrices par E-test. **(I)** souche *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème. **(II)** souche *P. aeruginosa* résistante à la rifampicine.

3. Recherche phénotypique des carbapénémase

3.1. Test MALDI TOF ultraflex

Parmi les 34 souches de *P. aeruginosa*, 17 sont résistantes à l'imipénème avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) qui varie entre 12 à > 32 mg/L. Les 17 souches résistantes à l'imipénème ont été testées pour la détection des carbapénémases par MALDI TOF ultraflex. Pour valider ce test par MALDI TOF ultraflex, deux souches de référence ont été utilisées comme témoins : *Escherichia coli* 25922 comme témoin négatif et *Klebsiella pneumoniae* (« Kpnasey » souche de référence pour NDM-1) comme témoin positif.

Les résultats de l'ultraflex, sont analysés à l'aide d'un logiciel Flex Control 3.0. Les résultats des 17 souches montrent que chez 14 souches de *P. aeruginosa* le pic spécifique de l'imipénème à 300 m/z disparaît complètement au cours de la période d'incubation de 4 heures, avec une augmentation du pic spécifique du métabolite à 254 m/z et un rapport entre l'aire sous la courbe du pic de l'imipénème / son métabolite < 0.5 ce qui confirme la présence d'une carbapénémase chez les 14 *P. aeruginosa*.

Concernant les 3 souches de *P. aeruginosa*, le pic spécifique de l'imipénème apparaît à 300 m/z. Après une période d'incubation de 4 heures, avec un rapport de l'aire sous la courbe du pic de l'imipénème / son métabolite > 0.5, on peut confirmer, donc une absence d'une carbapénémase [87]. (Fig. 27).

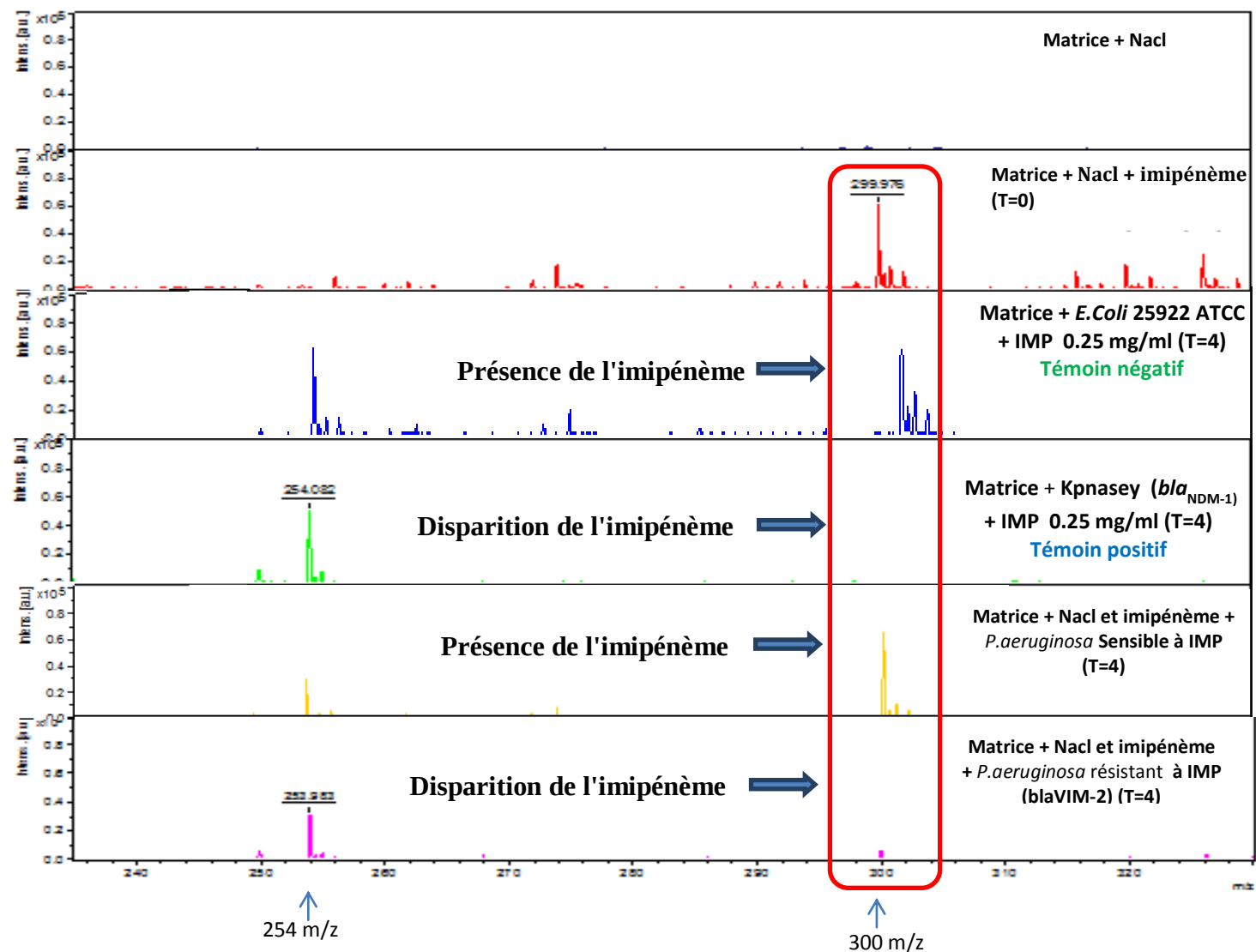


Fig.27. Hydrolyse de l'imipénème par Spectres de masse MALDI TOF Ultraflex de deux souches de *P. aeruginosa* (l'une résistante à l'imipénème possède le gène *bla*_{VIM-2} et l'autre est une souche sensible à l'imipénème. Après une incubation à 37°C pendant 4 heures avec une concentration de imipénème à 0,25 mg / ml; NaCl 0,45%. Les unités de l'axe ordonné (verticale) représentent la masse par charge en Daltons [m / z (Da)] et celles de L'axe des abscisses (horizontale) représentent une intensité relative (unités arbitraires).

3.2. Test de synergie EDTA-IMP : Détection des métallo- β -lactamases (M β L)

Le résultat du test de synergie EDTA -IMP des 17 souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistants à l'imipénème, nous montre après une incubation de 24heures à 37°C :

« Pour chaque souche, on a effectué deux méthodes sur la même boîte ensemencée »

- Première méthode : « deux disques d'antibiotiques d'imipénème l'un d'eux comporte de l'EDTA » : on observe chez 14 souches de *P. aeruginosa* une synergie entre les deux disques. Ce qui confirme que les 14 souches sont productrices d'une Metallo- β -lactamase (M β L). (Fig. (A) 26).

- Deuxième méthode : « deux disques l'un d'antibiotiques imipénème et l'autre un disque vierge » : on remarque que le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul d'au moins 6mm chez 14 souches de *P. aeruginosa*. On peut donc les considérer comme des souches productrices de M β L. (Fig. (B) 26).

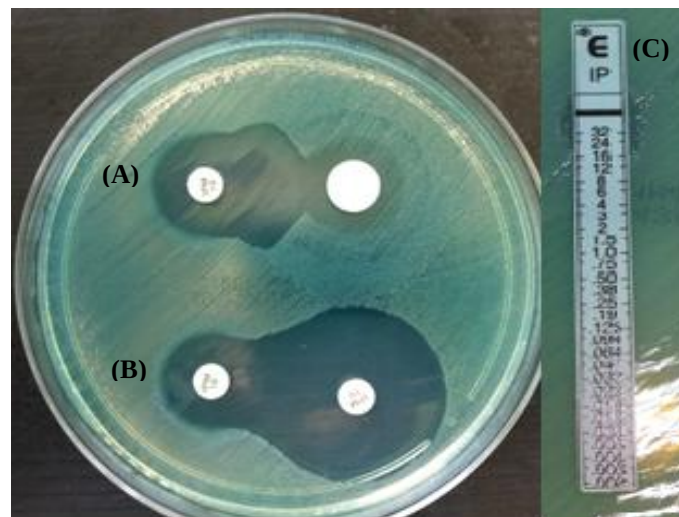


Fig.28. Test de synergie EDTA-IMP chez des souches *P. aeruginosa* productrice d'une carbapénémase. **(A)** Un disque d'imipénème et un disque vierge avec de l'EDTA; après une incubation une synergie entre les deux disques. **(B)** deux disques d'imipénème l'un d'eux avec de l'EDTA ; après une incubation, on remarque une synergie. **(C)** CMI de l'imipénème d'une souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème VIM-2 positif (CMI > 32 mg / ml).

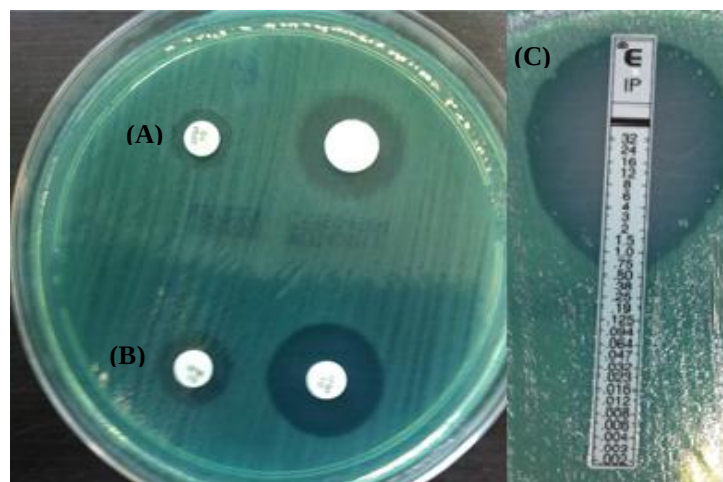


Fig.29. Test de synergie EDTA-IMP chez une souche de *P. aeruginosa* qui n'est pas productrice d'une carbapénémase. **(A)** disque d'imipénème et un disque vierge avec de l'EDTA; après une incubation on remarque que y a pas de synergie. **(B)** deux disques d'imipénème l'un d'eux avec de l'EDTA, après une incubation, aucune synergie. **(C)** CMI de l'imipénème d'une souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème mais qui ne procède pas une carbapénémase (CMI > 0.75 mg / ml).

4. Détermination des supports génétiques de résistance

4.1. Détection moléculaire des gènes codants pour des carbapénèmase

4.1.1. PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une technique rapide et efficace qui nous a permis d'éliminer la présence d'une carbapénèmase de type oxacillinase (OXA- type β -lactamase) selon le classement de Ambler class D β -lactamase. Le résultat de la PCR en temps réel nous montre que les 17 souches *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème ne possèdent aucune oxacillinase, les gènes testés sont les suivant : *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, et *bla*_{OXA-51}.

4.1.2. PCR standard

Le résultat de la PCR standard des gènes codant pour une carbapénèmase de type métallo- β -lactamase, après une électrophorèse sur gel d'agarose montre que sur les 17 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème, 14 sont positives au gène *bla*_{VIM-2} (Fig. 27). Ce qui confirme le test de synergie EDTA-IMP.

Aucune souche ne possède *bla*_{GIM}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, et *bla*_{KPC}

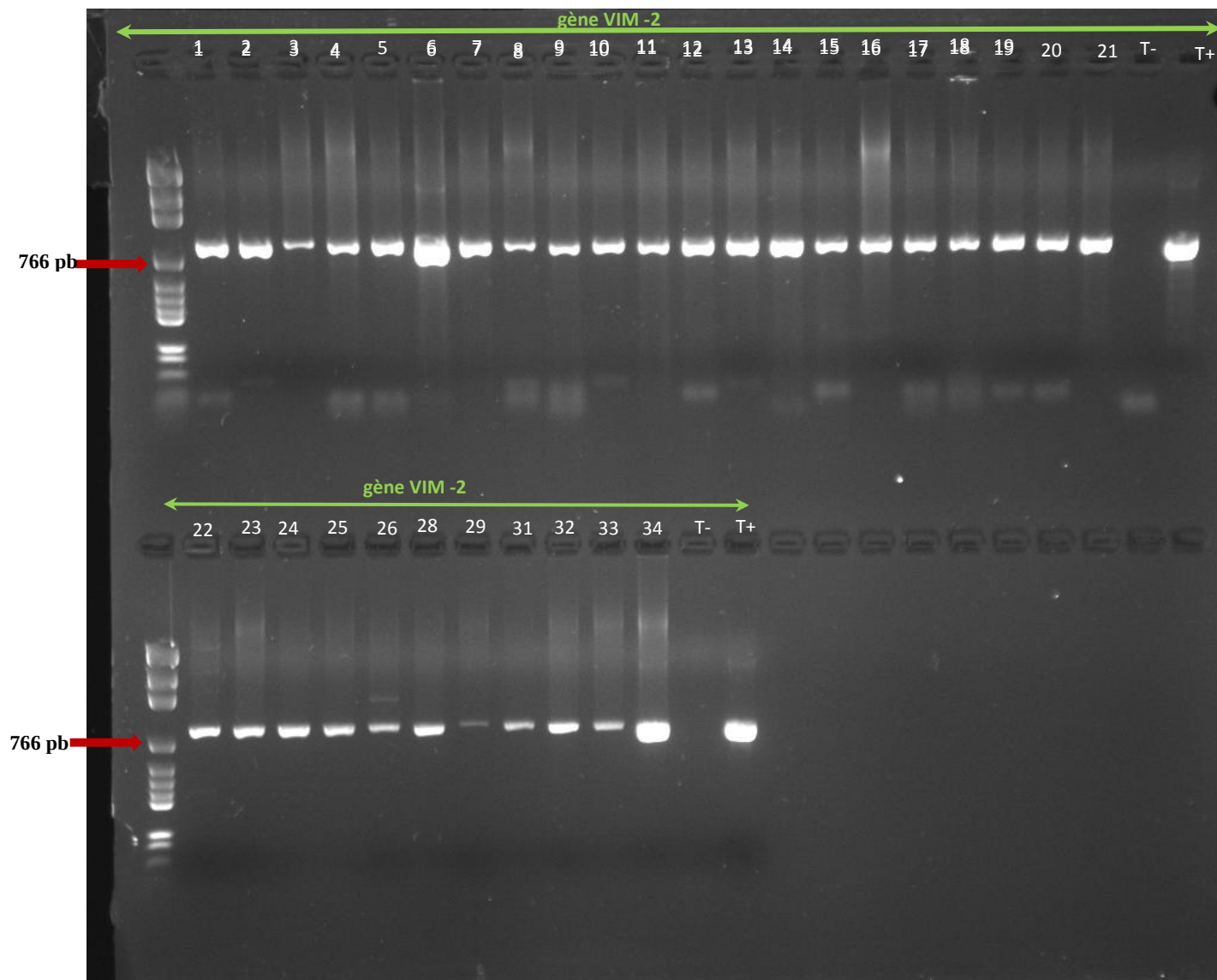


Fig.30. Amplification du gène *bla*_{VIM-2} par (PCR) des 34 souches *P. aeruginosa* isolées au niveau des services de réanimation

4.2. Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre étendu

Au cours de notre travail, les résultats de l'amplification du gène *bla*_{SHV-2} par PCR standard ont montré que sur les 34 souches de *P. aeruginosa* isolées seulement 3 sont positives. (fig. 30).

Aucune souche de *P. aeruginosa* ne possède une β -lactamases de classe A d'Amibler ; *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}.



Fig. 31. Amplification du gène *bla*_{SHV} par PCR des 34 souches *P. aeruginosa* isolées au niveau des services de réanimation

4.3. Recherche moléculaire de la résistance associée

Les résultats de l'amplification des gènes *aadB* et *aacA4* de la famille des aminosides a montré que sur les 34 souches de *P. aeruginosa* 14 souches étaient positives aux deux gènes *aadB* et *aacA4*.

Mais aucune souche ne possède le gène *arr-6* pour rifampicine ni pour les gènes de résistance des quinolones des gènes *qnrA* et *qnrB*.

5. Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés

L'analyse des séquences des produits de PCR purifiés du gène *bla_{VIM-2}* obtenus à partir des 14 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème et positives au test de synergie EDTA-IMP, montre qu'elles sont 100% identique à celle du numéro d'accès Genbank HQ285722.

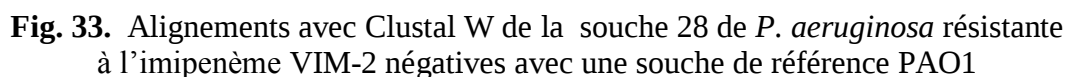
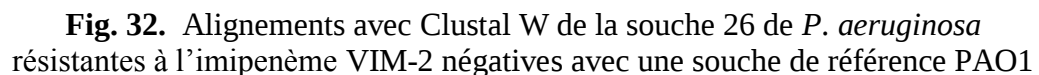
En ce qui concerne les 3 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème mais qui ne possèdent pas une carbapénémase (le gène *bla_{VIM-2}*) et négative au test de synergie EDTA-IMP, une analyse génétique a été faite de la porine OprD. Après un séquençage, une correction des séquences avec le logiciel codan code alinger a été réalisée, suivie par des alignements avec Clustal W (site web NPS alignement) des trois souches avec une souche de référence PAO1 pour comparer les séquences afin de détecter le type et l'endroit de la mutation. (Fig. 34).

Les résultats de ces trois souches résistantes à l'imipénème VIM-2 négatives révèlent une mutation induisant un "codon stop" prématurée de : la souche 26 (₅₂₉ CGA to TGA), (Fig. 31), souche 28 (₁₉₃ TGGA to TG - A), (Fig. 32) et la souche 32 (₇₅₇ TCG to TAG). (Tab. 15) (Fig. 33). (Fig. 34). (Tab. 16)

Le séquençage et les corrections des séquences du gène *bla_{SHV-2}* par le logiciel codan code alinger sont Blastées dans NCBI blast. Le résultat montre 100% d'identification avec le numéro d'accès Genbank AM988779.1

Tab. 16. Différentes mutations de type OprD qui se trouvent chez les 3 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème VIM-2 négatives

Souches OprD	Mutation de l'OprD substitutions/délétion/addition	Modification de la structure par les mutations de l'OprD
souche 26	Apparition un "codon stop" prématurée type de mutation par substitution	₅₂₉ <u>C</u> GA to <u>T</u> GA
souche 28	Apparition un "codon stop" prématurée type de mutation par délétion	₁₉₃ TG <u>G</u> A to TG - A
souche 32	Apparition un "codon stop" prématurée type de mutation par substitution	₇₅₇ T <u>C</u> G to T <u>A</u> G



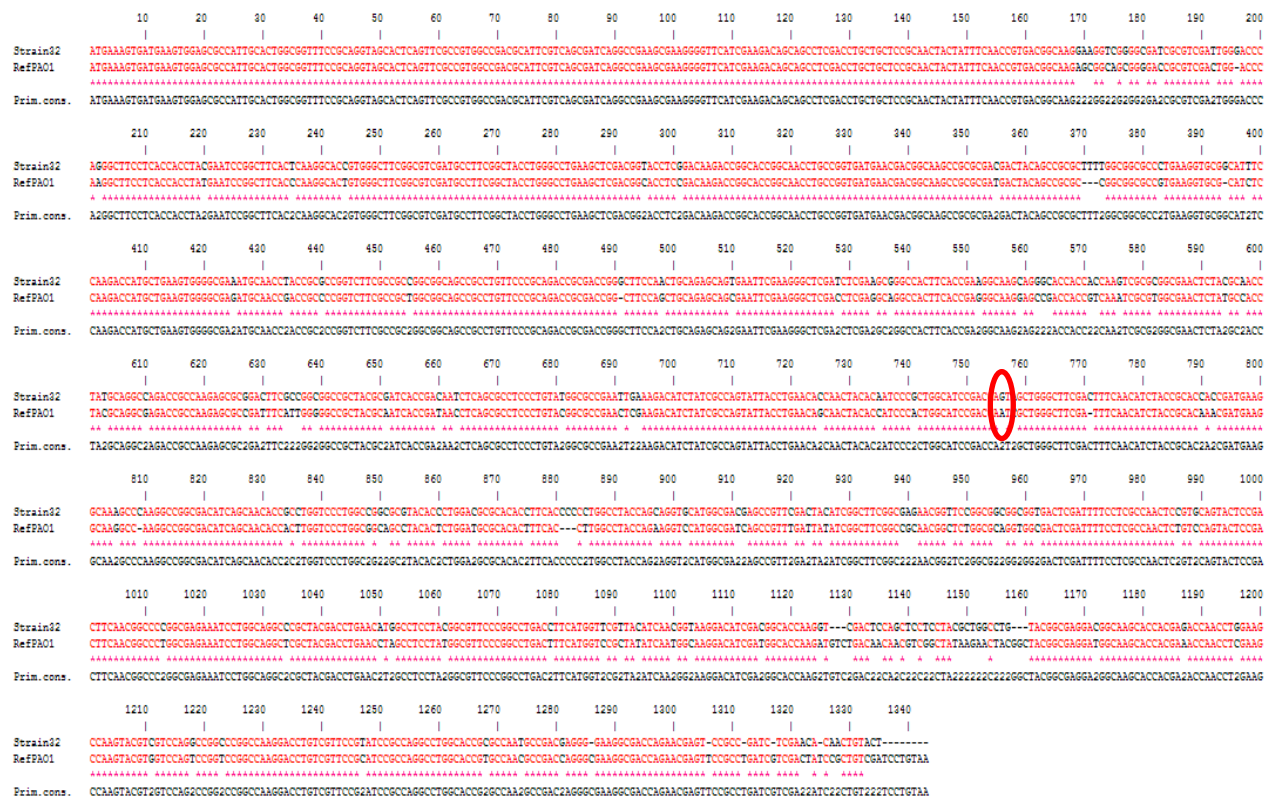


Fig. 34. Alignements avec Clustal W de la souche 32 de *P.aeruginosa* résistante à l'imipénème VIM-2 négative avec une souche de référence PAO1

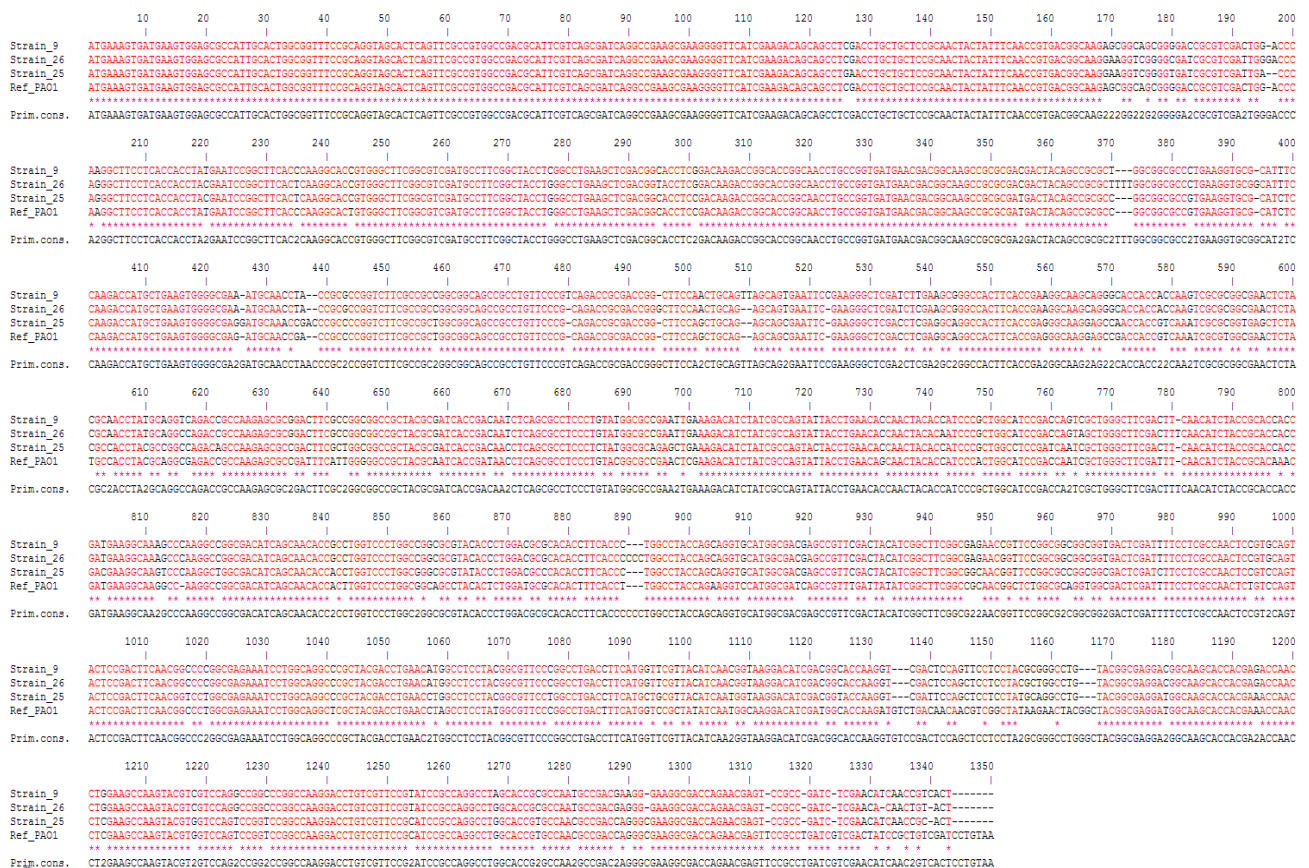


Fig. 35. Alignements avec Clustal W des trois souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème VIM-2 négatives avec une souche de référence PAO1

6. Organisation génétique du gène *bla*_{VIM-2}

Afin d'étudier l'Organisation génétique du gène *bla*_{VIM-2} des 14 souches de *P. aeruginosa* positives, les couples d'amorces ont été designés au sein du laboratoire à l'aide du logiciel primer 3 : amorce class 1 integron/VIM-2 [class 1 integron-F (3'-ACCGTGGAAACGGATGAAG-5'), VIM-2-R (3'-GTCATGAAAGTGCGTGGAGA-5')] et l'amorce VIM-2/ aac4' [VIM-2-F (3'-TGTCCGTGATGGTGTGAGT-5'), aac4' (3'-TATTCCGCGTACTCCTGGAT-5')]. Après une amplification par PCR (fig. 36, 37) et un séquençage suivis d'une correction des séquences avec le logiciel codan code alinger.

Le résultat montre que ce gène a été localisé dans un nouvel intégron de classe 1 qui contient également un gène codant pour *aadB* et pour *aacA4* (fig.35). Les 14 souches de *P. aeruginosa* produisent le gène VIM-2 qui porte le même intégron.

La séquence de cet intégron, n'a jamais été décrite dans la littérature donc elle a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accension Genbank **JX120362**.

ISPa séquence insertion de *P. aeruginosa* ; Int L1, integrase ; *bla*_{VIM-2}, metallo-β-lactamase ; *aadB*, aminoglycoside adenylyltransferase ; *aacA4*,aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase.

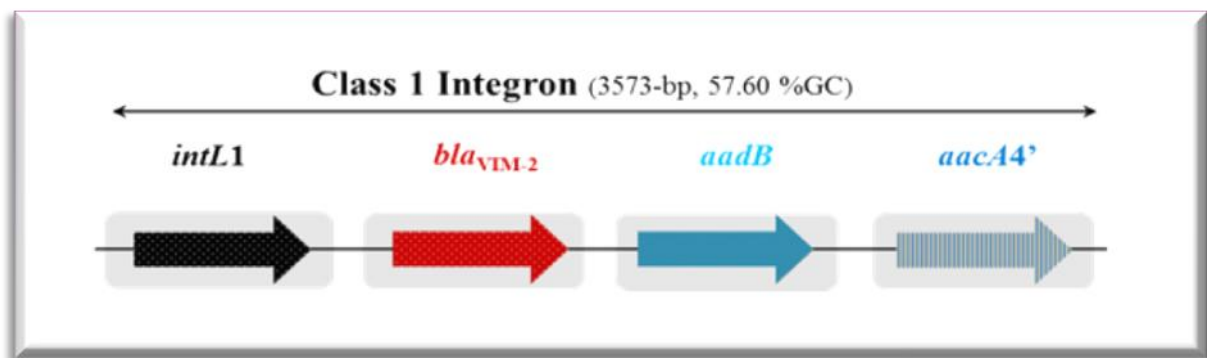


Fig. 36. Organisation génétique du nouvel intégron classe I de 3573pb contenant les gènes codant *bla*_{VIM-2}, *aadB*- and *aacA4*. Le numéro de l'association à GenBank est **JX120362**.

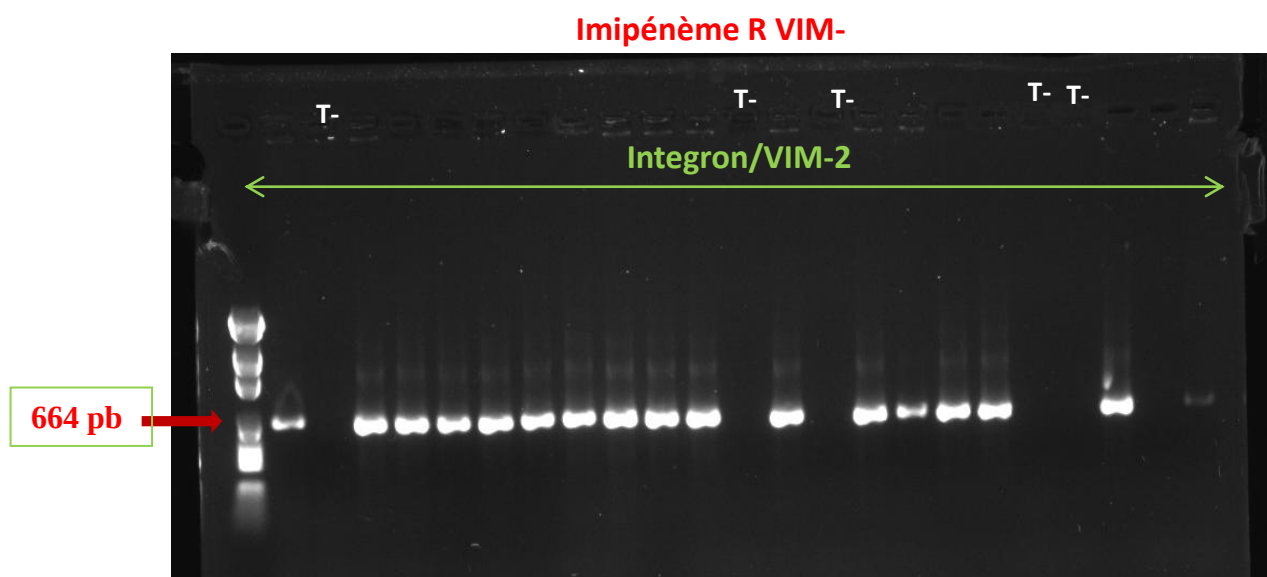


Fig. 37. Amplification du gène **Integron/VIM-2** par PCR des 14 souches de *P. aeruginosa* VIM-2 positives

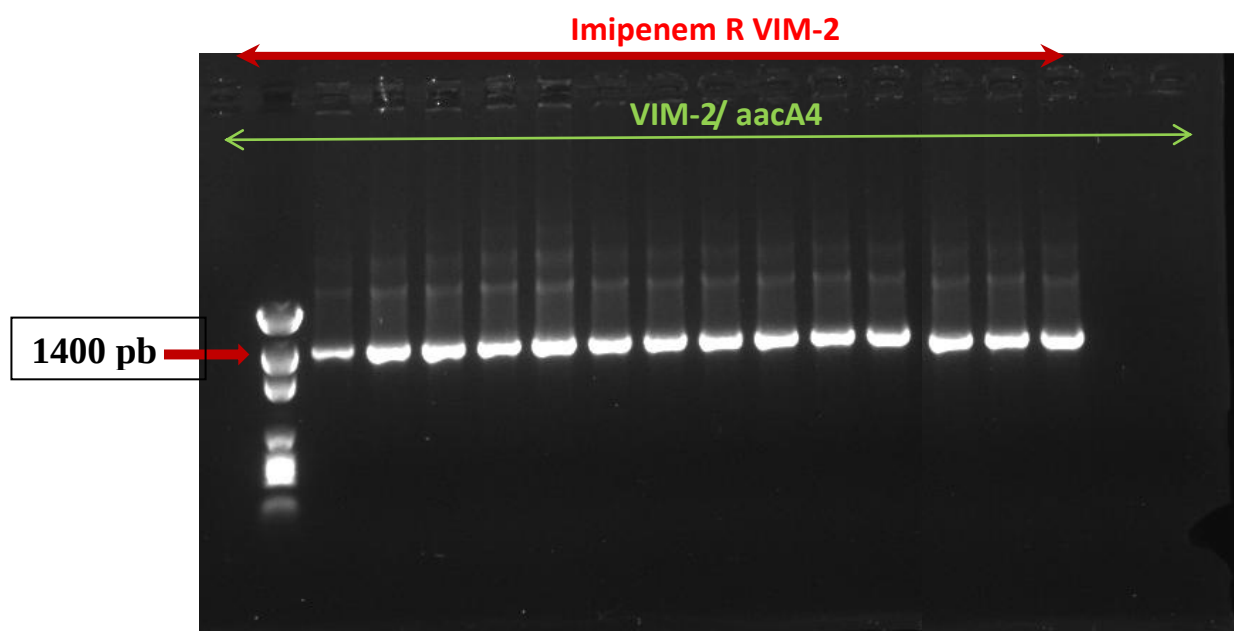


Fig. 38. Amplification du gène **VIM-2/ aacA4** par PCR des 14 souches *P.aeruginosa* VIM-2 positives

7. Multi-locus séquence typing MLST

L'enquête sur la clonalité des 17 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème, a été faite par une amplification par PCR standard et un séquençage des sept gènes de ménage *acsA*, *aroE*, *mutL*, *ppsA*, *gua A*, *nuoD*, et *trpE* précédemment rapportés.

Les séquences obtenues après le séquençage ont été soumises à une base de données PubMLST [<http://pubmlst.org/paeruginosa>], les résultats sont exprimés dans le tableau 17.

Le typage génomique multilocus (MLST), a révélé qu'elles appartiennent à 4 différents types de ST, ST162 (une souche), ST654 (une souche), ST1175 (une souche), et une nouvelle séquence type, ST1420 (quatorze souches). Cette nouvelle séquence a été récemment présentée dans la base de données PubMLST [<http://pubmlst.org/paeruginosa>] en Chine (janvier 2013). (Tab. 17. 18).

L'Arbre phylogénétique est déduit de la concaténation des séquences partielles des sept gènes de ménage. Les séquences obtenues ont été alignées par le logiciel ClustalX, ensuite analysées par le logiciel Mega version 4.1, en utilisant la méthode Neighbour-joining avec le modèle de distance paramètre Kimura ; les valeurs de bootstrap sont exprimées en pourcentage de 1000 répétitions et présentées à un point de branchement.

Comme le montre la figure 39, l'analyse de l'arbre phylogénétique, à partir de la concaténation de ces séquences partielles, révèle la présence de trois clones A,B et C différents, suggérant la diffusion de la classe I Intégron plutôt que d'une épidémie due à un seul clone. (fig. 39).

Tab. 17. Analyse des 17 souches de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème par MLST

	allèles								
N°								Séquence	
souches	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE	type	VIM
2	5	61	25	133	1	20	125	1420	VIM-2
3	5	61	25	133	1	20	125	1420	VIM-2
4	6	150	6	34	27	3	7	162	négatif
5	5	61	25	5	1	20	125	1420	VIM-2
6	5	61	113	5	1	20	125	1420	VIM-2
9	103	61	25	5	1	20	125	1420	VIM-2
11	5	61	25	5	1	20	125	1420	VIM-2
13	5	61	25	5	1	104	125	1420	VIM-2
14	5	61	25	133	1	20	125	1420	VIM-2
15	5	61	25	133	1	20	125	1420	VIM-2
17	5	61	25	133	1	20	125	1420	VIM-2
19	5	75	5	54	5	11	60	1175	négatif
21	5	61	25	133	1	20	125	1420	VIM-2
24	5	61	25	5	1	20	125	1420	VIM-2
26	5	61	25	5	1	20	125	1420	VIM-2
32	17	150	26	116	4	4	26	654	négatif

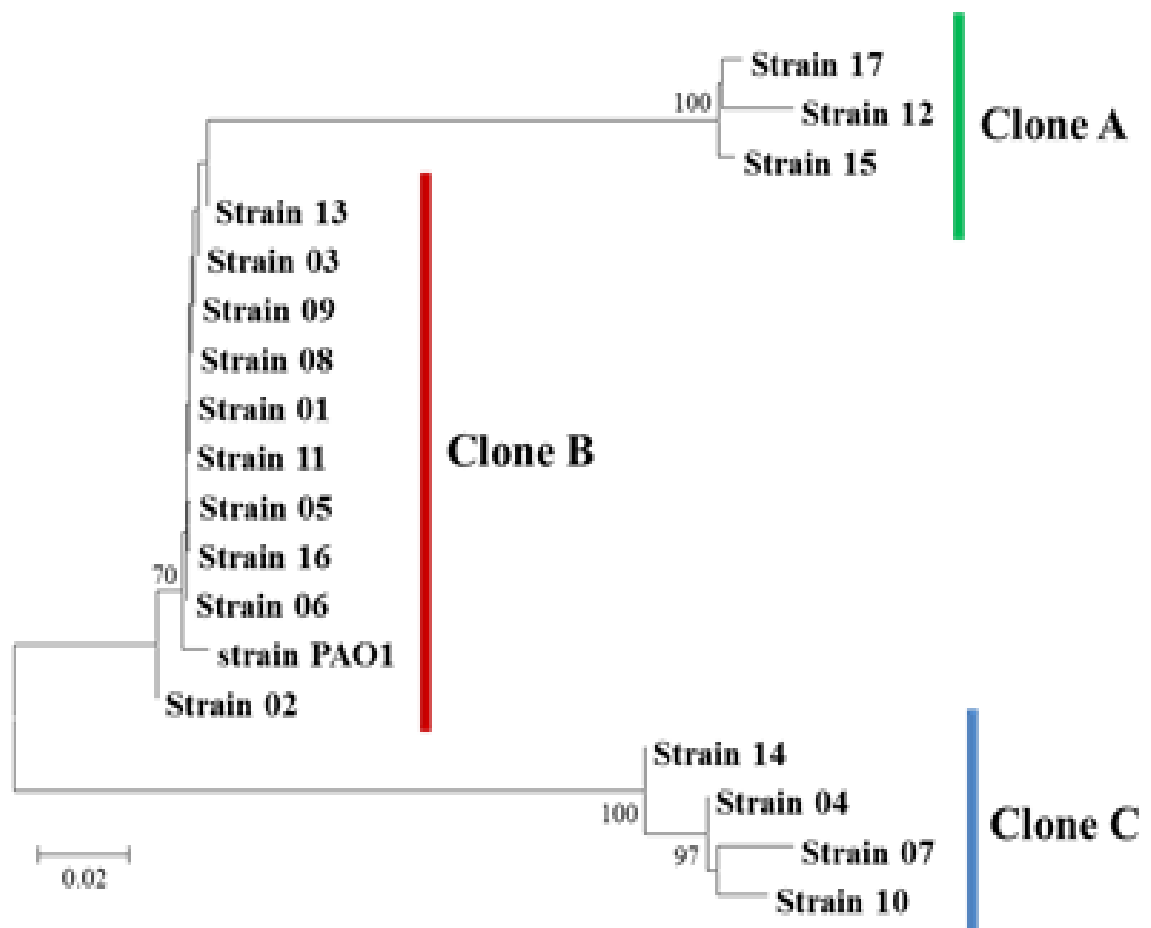


Fig. 39. Arbre phylogénétique déduit à partir de l'analyse des séquences des gènes de ménage.

Discussion

Depuis déjà une trentaine d'années, les bactéries à Gram négatif non fermentants sont considérées comme des pathogènes opportunistes, émergents, multi-résistants. Le plus souvent, ils sont responsables d'infections nosocomiales difficiles à contrôler et à traiter, en particulier dans les unités des soins intensifs [143;198].

Acinetobacter baumannii est une bactérie qui fait partie de la bactériocénose. Sa présence dans les respirateurs (système de ventilation), où elle peut constituer un biofilm, facilite les pneumopathies. Ainsi, incrustée, il est difficile de l'éliminer par simples mesures d'antibiothérapie et de désinfection [82].

L'utilisation intensive d'agents antimicrobiens dans les hôpitaux est l'un des facteurs qui contribue à l'émergence de souches multi-résistantes, insensibles à une large gamme d'antibiotiques, y compris la nouvelle génération, à large spectre des β -lactamines, les aminosides et les Fluoroquinolones.

L'analyse globale de la littérature laisse apparaître, que *A. baumannii* est essentiellement rencontrée aux services de réanimation (88 %). Cet isolement si fréquent serait en rapport avec des épisodes épidémiques causés par la forte contamination de l'environnement des patients porteurs [150].

SAMOU [169], auteur d'une thèse de doctorat en médecine rapporte un taux de 7.9% d'incrimination de *A. baumannii* dans toutes les infections déclarées en une année au Mali (2004-2005). Ce taux nous paraît trop faible à cause des facteurs liés aux types d'étude ou à l'échantillonnage et autres [135].

En 2007, en Tunisie Hammami., S., [73] déclare ce microorganisme comme responsable de 22% des infections enregistrées au niveau des unités de soins intensifs. Alors que ce taux était de 62% dans les services de chirurgie.

Au Maroc, une étude faite entre Janvier 2003 et Décembre 2005 montre que 50.53% des *A. baumannii* sont responsables d'infection, au niveau des unités de soins Intensifs dans un hôpital universitaire de Casablanca [96].

En Inde, de toutes les infections à *Acinetobacter baumannii*, 41.8% se sont déclarées au service des soins intensifs [155].

Une étude Canadienne a montré que *A. baumannii* représente le 20^{ème} agent responsable d'infection dans les services de réanimation.

A l'échelle européenne, *Acinetobacter baumannii* représente le 7^{ème} agent responsable d'infection nosocomiale, causant 10% des pneumopathies [96].

En Algérie, *A. baumannii* représente 39.9% des infections qui surviennent en réanimation selon le réseau de surveillance Algérien. Ce sont des taux qui restent relativement faibles si on les compare aux données de nos voisins sus-cités [159].

En Europe, environ 27% des souches sont résistantes aux carbapénèmes. Les résistances à la Ceftazidime (C3G) et à la Ciprofloxacin (Fluoroquinolones) sont environ de 66% des souches, et plus de 50% des isolats sont résistants à la Gentamicine (aminoside) [143].

En Amérique du nord, les proportions de souches résistantes aux C3G, aux aminosides et aux Fluoroquinolones sont plus faibles. Les résultats respectifs sont : 35 à 40%, 10% à 30% et 35% à 40% [143]. 25% à 37% de ces souches sont responsables d'infections nosocomiales qui sont engendrées par des dispositifs médicaux ou par le site opératoire. Elles sont aussi résistantes aux carbapénèmes [76].

En Amérique latine, le taux de résistance à ces antibiotiques atteint presque 30%. En Asie et Moyen orient, 25% des souches sont résistantes aux carbapénèmes, 40% aux C3G, 40% à l'ampicilline associée au sulbactam (Aminopénicilline + inhibiteur de β -lactamases), 35% aux aminosides et 45% aux Fluoroquinolones[143].

En Tunisie, une étude rétrospective faite entre 2001 à 2003, révèle que 34% des souches *A. baumannii* isolées, sont résistantes à l'Imipénème, une moyenne de 86.5% des souches sont résistantes aux aminosides et 91% sont résistantes à la Ciprofloxacin des Fluoroquinolones [168].

Au Maroc, la résistance aux β -lactamines est très élevée : 91 % à la Cefotaxime, 50,3 % à la Ceftazidime et 42,6 % à Imipénème. La résistance aux aminosides varie de 17,9 % pour la Nétilmicine à 72,1 % pour la gentamicine. La résistance aux Fluoroquinolones (Ciprofloxacin) est de 65,8 %.[96]

En 2012 le réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN), dans son 12^{ème} rapport montre qu'au niveau national dans les services de réanimation la résistance aux β -lactamines groupe des cephèmes est de 72%, groupe des pénames : 76.1%, et pour les carbapénèmes : 39.3%.[159].

Selon l'AARN, les aminosides, associés en général aux β -lactamines, montrent aussi des résistances non moindres allant jusqu'à 53.7% des souches considérées. Selon toujours le même rapport, les quinolones (Ciprofloxacine) sont actifs sur 84% des souches [159].

Sur une période de onze mois on ne peut prétendre à des résultats significatifs. Par ailleurs, l'absence de donnée sur l'écologie bactérienne des services de réanimation constitue un manque non négligeable. D'un autre coté le manque de données sur le cheminement des malades ne nous permet pas de définir avec précision l'origine des bactéries BGN-NF isolés de divers prélèvements.

Néanmoins, notre étude enregistre une totale résistance aux β -lactamines testées du groupe des cephèmes, pénames et monobactames. Et seul l'imipénème des carbapénèmes reste actif sur uniquement 20% des souches testées. Nos souches sont à 65.53% résistantes aux aminosides et a 100% à la Ciprofloxacine.

Nous considérons avec les résultats obtenus que nous sommes en présence de souches multi-résistantes.

La résistance élevée à l'imipénème est très inquiétante car elle perturbe le protocole de traitement des patients. Au niveau des services de réanimation, l'imipénème est l'antibiotique de choix en particulier, pour le traitement des infections nosocomiales.

Devant ces bactéries multi-résistantes et surtout une résistance accrue aux β -lactamines "outil" essentielle de lutte contre les infections dans les unités de soins intensifs, il est impératif de rechercher les supports génétiques et le type de résistance.

Les résultats de notre travail sur les supports génétiques des résistances aux β -lactamines a permis de trouver 13 cas de BLSE toutes du type TEM-128.

Ce gène TEM-128 est un nouveau, différent d'une paire de base (pb) par rapport au gène bla_{TEM-1b}. il code pour une BLSE est apparu pour la première fois en Chine chez *A. baumannii* en 2004. La même année, au Danemark, ce gène est isolé à partir des souches

de *E. coli* et *Salmonella* trouvées dans l'alimentation des d'animaux. En 2007, en Norvège, il est isolé chez *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*. [189].

Les carbapénèmes ont une puissante activité contre les souches de *A. baumannii*, jusqu'à nos jours. Ils étaient souvent utilisés pour traiter les infections causées par ces souches multi-résistantes. Malheureusement, ces dernières années, l'émergence et la propagation de la résistance aux carbapénèmes ont été rapportées. Elle est principalement attribuée à la production des carbapénémases, qui peuvent être de classe D d'hydrolyse des carbapénèmes oxacillinases ou, moins fréquemment, classe B métallo β -lactamases. La classe D les oxacillinases chez *A. baumannii* sont principalement représentés par les gènes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}* et *bla_{OXA-58}* [88;143].

Des épidémies de souches *A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes ont été documentées dans diverses zones géographiques, y compris l'Amérique, l'Europe et l'Extrême-Orient. Mais peu d'informations sont disponibles à partir de l'Afrique du Nord [88;143]. Cependant, le gradient Nord/ Sud de la résistance à l'imipénème en Europe suggère que la prévalence de la résistance imipénème en Afrique du Nord peut être élevée.

Durant notre travail, on a déterminé la résistance des antibiotiques sur une série de souches cliniques *A. baumannii* à l'hôpital universitaire d'Annaba – Algérie. Sur une période de onze mois (de Novembre 2010 à Septembre 2011), et on a caractérisé les gènes codant pour des carbapénémases et les résistances associées (aminoside, fluoroquinolones et rifampicine).

Dans notre recherche bibliographique, nous avons remarqué qu'il y avait très peu de données disponibles sur la résistance des *A. baumannii* aux carbapénèmes en Afrique du nord, notamment en Algérie.

Une étude antérieure, réalisée entre Mars 2003 et Janvier 2004, aux niveaux de neuf hôpitaux universitaires, dans la région méditerranéenne (quatre en l'Algérie, deux en Tunisie et trois en France) a montré que le pourcentage de résistances à l'imipénème chez *A. baumannii* varie selon les pays allant de 5,2 % en Algérie à 28,8% en Tunisie [4]. Cependant, nous croyons que les données sus-citées plus récentes ne peuvent pas être comparées à cette étude plus antérieure puisque la prévalence de la résistance à l'imipénème des *A. baumannii* a considérablement augmenté depuis 2005 dans le monde entier avec une augmentation du gradient de la prévalence Nord - Sud en Europe [88].

Par ailleurs, cette prévalence apparaît plus élevée dans notre étude. Elle peut être due à une épidémie et / ou une situation endémique à l'hôpital d'Annaba car les isolats sont réalisés durant une courte durée d'un an. La majorité de ces isolats ont été réalisés sur des patients hospitalisés dans les services de réanimation, atteints d'infection respiratoire. Celle-ci a été fréquemment signalée dans la plupart des études publiées.[88].

Le génotypage a été déterminé par la comparaison des séquences du gène *recA* avec les génotypes préalablement déposés dans MLST Pasteur. Cette comparaison montre que ce sont les mêmes souches qui reviennent. On peut dire que c'est une petite épidémie dans l'unité de soins intensifs chez les adultes. Sur les 24 patients de notre étude, 6 sont finalement décédés (25%), ce qui confirme le niveau élevé de la mortalité due aux infections à *A. baumannii*. En Europe depuis 2003, ils ont rapporté un taux de mortalité allant de 3 à 67% [88].

Dans notre étude, le principal support moléculaire de la résistance aux carbapénèmes a été la présence du gène *bla_{OXA-23}* codant pour une carbapénémase ainsi que la coexistence de gène *bla_{OXA-58}* pour certaines souches. Le gène *bla_{OXA-23}* codant carbapénémase a été initialement détecté chez *A. baumannii* en Ecosse en 1985, avant l'introduction des carbapénèmes. Ensuite, ceux-ci ont été signalés de plus en plus dans le monde, en provenance d'Afrique, d'Europe, d'Asie du Nord et en Amérique latine [143]. Ce gène est maintenant considéré comme un gène d'épidémie mondiale de *A. baumannii* [88].

En Afrique, les souches de *A. baumannii* producteur des gènes *bla_{OXA-23}* ont été isolées en Afrique du Sud, la Libye, l'Egypte et en Tunisie[73]. Au meilleur de nos connaissances, une seule souche de *A. baumannii* productrice du gène *bla_{OXA-23}* a été isolée chez un patient en Algérie en 2010 [125]. Au cours de notre travail, nous avons isolées deux souches qui contenaient le gène *bla_{OXA-58}* dont l'une des souches contient à la fois le gène *bla_{OXA-58}* et le gène *bla_{OXA-23}*.

Le gène *bla_{OXA-58}* a été déjà rapporté dans le monde entier, y compris en Algérie, à Tlemcen en 2008, chez 12 souches cliniques de *A. baumannii* [55]. Toutefois, la coexistence d'une souche, portant deux gènes de résistance à la fois *bla_{OXA-58}* et *bla_{OXA-23}* n'a jamais été décrit en Algérie auparavant, bien qu'elle ait été signalée en Chine (*bla_{OXA-23}* et *bla_{OXA-58}*) et en Thaïlande (*bla_{OXA-23}* et *bla_{OXA-58}* et *bla_{OXA-24}*) [120]. Cela peut suggérer que l'épidémiologie des gènes codant pour carbapénémase a changé en Algérie avec le gène *bla_{OXA-23}* car c'est le gène le plus répandu des carbapénémases circulant dans ce pays [79].

La description récente d'une souche clinique, contenant le gène *bla*_{NDM-1}, chez un patient hospitalisé à Paris, en France, qui a été rapatrié d'Oran, en Algérie, en Juillet 2011 [28], est susceptible de suggérer que l'épidémiologie de la résistance aux carbapénèmes peut encore changer en Algérie. C'est pour cela, il faut faire plus d'investigations et de surveillance pour garantir l'acquisition d'une meilleure compréhension de l'épidémiologie et le support moléculaire de la résistance aux carbapénèmes en Afrique du Nord.

Les Séquences d'insertion (IS) sont les plus petits éléments transposables et les plus abondants. Ces éléments contiennent des promoteurs forts qui jouent un rôle majeur dans l'expression des gènes de la résistance aux antibiotiques, situés en aval du site d'insertion de ces éléments mobiles. Récemment, un élément nommé *ISAbal* a été identifié dans une souche *A. baumannii*. La Séquence d'insertion *ISAbal* a été associée à une surexpression de gènes de résistance *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-51}. Ce qui leur confèrent une résistance aux carbapénèmes [44;177]. Dans ce travail, nous avons constaté *ISAbal* était en aval du gène *bla*_{OXA-23} et sont également en amont du gène *bla*_{OXA-23}. Alors que La Séquence d'insertion *ISAbal3* a été trouvé en amont du gène *bla*_{OXA-58} cette souche contient également *ISAbal* en aval du gène *bla*_{OXA-23}.

Dans cette étude, nous avons utilisé une nouvelle méthode pour la détection des résistances aux carbapénèmes avec le MALDI TOF Ultraflex. Cette méthode a permis le diagnostic rapide des souches de *A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes. Cette technique est simple, peu coûteuse. Ce test peut être considéré comme une des méthodes de routine pour l'identification des souches résistantes aux carbapénèmes [87].

Ces résultats mettent l'accent sur la diffusion dans le monde entier des gènes de carbapénémase de type oxacillinase (OXA), dans les souches cliniques multi-résistantes (BMR) de *A. baumannii* et de la diffusion rapide de la résistance aux carbapénèmes des gènes codant pour *bla*_{OXA-23} en Algérie.

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiale, en particulier dans les services de réanimation. Dans la majorité des cas, l'infection à *P. aeruginosa* est opportuniste. Elle survient chez les patients fragilisés (opéré récent, patient sous assistance respiratoire...). Cette bactérie peut-être responsable d'infections graves (pulmonaires, septicémiques, urinaires) nécessitant l'utilisation d'antibiotiques coûteux et le plus souvent en association [18;65;183].

La progression de la résistance aux antibiotiques (les bêta-lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones), pose actuellement des problèmes dans la prise en charge des malades. Malgré une thérapeutique précoce, par une antibiothérapie adaptée et à forte dose, l'effet bactericide sur le bacille pyocyanique est de plus en plus difficile à atteindre [19]. La résistance qui en résulte, permet à la bactérie de s'adapter temporairement à son environnement [10].

L'acquisition d'une infection liée à une souche multi-résistante de *P. aeruginosa* chez un patient hospitalisé, en réanimation, dépend à la fois de l'effet de pression de sélection des antibiotiques et de la transmission croisée [47;197].

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* surviennent essentiellement en réanimation et plus particulièrement chez des patients immunodéprimés [18;58;65].

Aux Etats-Unis, *Pseudomonas aeruginosa* occupe la cinquième place parmi les espèces responsables d'infections nosocomiales en réanimation [58].

En Europe, *P. aeruginosa* occupe la troisième place dans les infections nosocomiales en réanimation, après *Staphylococcus aureus* et *Enterobacteriaceae* essentiellement les genres *Klebsiella* et *Enterobacter*; [*E. coli* est retrouvé moins fréquemment que dans l'ensemble des infections nosocomiales en réanimation (9,1% dans les USI contre 20,1% pour l'ensemble de l'hôpital)] [2].

En Algérie, *P. aeruginosa* occupe la troisième place après *Staphylococcus aureus* et *Enterobacteriaceae* dans les infections nosocomiales au niveau des soins intensifs [159].

P. aeruginosa est résistant naturellement à un grand nombre d'antibiotiques. Les fluoroquinolones, les aminosides, quelques β -lactamines dont les carbapénèmes, et la colistine sont efficaces contre cette bactérie. Les résistances acquises contre ces quelques

antibiotiques sont fréquentes, rendant la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* de plus en plus compliquée.

En Europe, *P. aeruginosa* possède une résistance aux fluoroquinolones de 22,8%, suivie par celle aux carbapénèmes 19,0%. Les résistances aux aminosides, à la Pipéracilline associée au Tazobactam ou encore au Ceftazidime (C3G) concernent chacune environ 15% des souches [186].

Au USA, les fluoroquinolones ont une résistance plus élevée avec un pourcentage de 30,7%, suivie par celle aux carbapénèmes avec un pourcentage 25,3%. Les résistances aux aminosides, à la Pipéracilline associée au Tazobactam ou encore au Ceftazidime (C3G) concernent chacune environ 17,5% des souches de *P. aeruginosa* [186].

Au Kenya, entre 2006/2007, une étude de 18 mois, sur des souches de *P. aeruginosa*, montre une résistance aux antibiotiques très élevée de 13,7% à l'imipénème avec des CMI hautement élevée $MIC_5 > 32$ mg/l. Pour la Pipéracilline et Aztreonam une résistance de 53%. Quant aux aminosides et les fluoroquinolones 100% de résistance [145].

Au Maroc, en 2005 une étude dans un hôpital à Rabat a montré une résistance de 23% à l'imipénème, souches productrices de métallo- β -lactamase sur une série de souches *P. aeruginosa*. Ces souches sont également résistantes aux fluoroquinolones, aminosides et rifampicine.

En Tunisie, Hammami S., 2010., montre sur une étude de *P. aeruginosa* de 2002 à 2006 au niveau de l'hôpital Charles Nicolas, une résistance à l'imipénème est de 43,9%. Ces souches montrent également une résistance très élevée aux fluoroquinolones, aminosides et rifampicine [72].

En Algérie, selon son 12^{ème} rapport, le réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN), montre qu'au niveau des services de réanimation sur tout le territoire national, que des souches de *P. aeruginosa*, présentent une résistance élevée aux β -lactamines, avec un taux de 17.3% des carbapénèmes. Ce groupe représente le taux le plus résistant des groupes des β -lactamines, suivi par le groupe pénames avec 16%. Le groupe céphèmes est de 15.2%, et pour les monobactames 16.9% [159].

Concernant les aminosides et les quinolones, l'AARN, montre une résistance des souches, respectivement de 5.3% et 15% [159].

A Annaba, notre travail rejoint les résultats du réseau AARN mais avec de légères différences. Ces différences découlent du petit échantillonnage utilisé au cours de notre investigation comparé à celui de l'AARN. Nous avons enregistré une résistance aux β -lactamines des groupes des cephèmes, pénames et monobactames, en moyenne de 17.6%. Quant à l'imipénème du groupe carbapénèmes, une résistance de 50%, ce qui représente le taux le plus élevé. Pour les aminosides 6.6% et les fluoroquinolones 56.6%.

Ces résultats obtenus nous confirment que nous sommes en présence de bactéries multi-résistantes (BMR).

Durant, ces dernières décennies, les souches *P. aeruginosa* résistent à un nombre croissant d'antibiotiques et d'une manière de plus en plus fréquente. L'imipénème est alors considéré comme un antibiotique de première intention, dans les infections nosocomiales en réanimation, car c'est l'antibiotique le plus efficace.

Ces bactéries constituent, ainsi, un problème majeur de santé publique, d'autant plus que très peu de nouvelles molécules sont mises sur le marché par l'industrie pharmaceutique. Ainsi, plusieurs auteurs ont tiré la sonnette d'alarme face à ce problème de résistance [10;15].

Devant, ces bactéries multi-résistantes, il nous est apparu dans notre travail, essentiel de rechercher les supports génétiques et le type de résistance.

Dans cette étude, nous avons signalé, pour la première fois, la présence du gène VIM-2 métallo- β -lactamase, de la classe B selon la classification de Ambler. Ce gène est produit par 14 souches de *P. aeruginosa* isolées à partir des prélèvements issus des services de réanimation aux CHU de Annaba- Algérie.

Au meilleur de nos connaissances, en Afrique du Nord, le gène VIM-2 codant pour une carbapénémase n'a jamais était signalé, sauf en Tunisie [72;92;111]. En effet, la Tunisie a signalé la présence du gène VIM-2 codant pour une carbapénémase des isolats cliniques de *P. aeruginosa*, mais aussi chez *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* isolées de l'environnement hospitalier [37;72]. Elle a aussi décrit le gène VIM-4 métallo- β -lactamase chez des souches cliniques de *K. pneumoniae* [91]. Dans d'autres pays d'Afrique, il n'existe que très peu de publications concernant la présence du gène VIM-2 chez *P. aeruginosa* : i)

une souche clinique de *P. aeruginosa* a été signalée chez un touriste de la Hongrie qui a été hospitalisé en Egypte [182] ; ii) un cas d'un patient qui a été transféré dans un hôpital en Norvège après avoir été hospitalisé au Ghana [170] ; iii) 57 souches cliniques récupérées de 2006 à 2007 à partir d'un grand centre tertiaire au Kenya [145]; iv) et 15 souches cliniques isolées à partir d'une unité d'hématologie, d'un hôpital de soins tertiaires à Cape Town, Afrique du Sud [80].

En comparant la diffusion des gènes VIM-2 chez *P. aeruginosa* en Europe et en Afrique, on remarque que la dissémination du gène VIM-2 en Europe beaucoup plus importante (Fig. 39).

En Algérie en 2010, à notre connaissance, seuls les gènes VIM-19 et VIM-4, ont été signalés dans 5 souches différentes d'entérobactéries (une *Providencia stuartii*, deux *Escherichia coli* et deux *K. pneumoniae*) [161] .

Cependant, d'autres gènes codant pour des carbapénémases ont été signalés en Algérie. Ce sont les gènes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} et *bla*_{OXA-58} chez des souches cliniques de *A. baumannii* [9;55;87;125;191]. Aucune oxacilline n'a été décrite chez *P. aeruginosa*, en Algérie.

En ce qui concerne, le gène NDM-1, il a été rapporté pour la première fois en Algérie chez une souche clinique de *A. baumannii* d'un patient hospitalisé à Oran et transféré à Paris [28] et une autre souche clinique de *A. baumannii* portant le gène NDM-1 chez un patient hospitalisé en Algérie et rapatrié en Belgique [24].

Le gène NDM-1 a été découvert pour la première fois chez *P. aeruginosa* en Serbie en 2011 [84], ensuite en France [63]. Les métallo- β -lactamase de type NDM sont moins fréquents que le type VIM chez *P. aeruginosa* à travers le monde.

L'émergence et la propagation des métallo- β -lactamase (MBL) chez *P. aeruginosa*, principalement de type VIM, ont été signalées dans de nombreux pays autour du monde [202]. Cette propagation représente un risque épidémiologique pour au moins deux raisons : la première est que les MBL confèrent non seulement une résistance aux carbapénèmes, mais aussi à presque toutes les β -lactamines. Elles sont souvent associées à la résistance aux aminoglycosides [72], comme ce fut le cas dans notre étude. La deuxième est l'émergence des VIM producteur de métallo- β -lactamase chez *P. aeruginosa* qui peuvent survenir indépendamment, dans différentes parties du monde, par le biais de

l'acquisition de différents gènes bla_{VIM} contenant les intégrons dans des souches de lignées clonales similaires en combinaison avec la diffusion clonale [72;134].

Ce fut le cas dans notre travail puisque le gène VIM-2 est situé sur un intégron de classe 1 qui est connu pour être facilement transférable entre les bactéries par rapport aux derniers intégrons classe I [72].

Dans notre travail, l'organisation génétique de l'intégron classe I a révélé une nouvelle organisation génétique qui contient en plus de intL1 intégrase et bla_{VIM-2} associée à deux gènes de résistance aux aminoglycosides aadB et aacA4 (fig. 35). Cette nouvelle cassette a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion Genbank **JX120362**. Confirmant la grande diversité des VIM-2- intégrons de classe I [72].

Enfin, les trois souches résistantes à l'imipénème qui ne contiennent pas VIM-2, présentent des mutations dans les séquences du gène oprD, conduisant à un "codon stop" prématuré dans la séquence protéique traduite qui est connue pour être responsable de la perte de la porine, ce qui confère la résistance à imipénème [134].

Le typage génomique multilocus (MLST) [48] a été réalisé sur les 17 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème a révélé que celles-ci appartiennent à quatre différents types de ST, dont trois types de ST déjà connus (ST162, ST654, ST1175) chez trois souches différentes de *P. aeruginosa*. Et une nouvelle séquence type, ST1420 présente chez quatorze souches. Cette nouvelle séquence type a été découverte récemment, en janvier 2013 en Chine. Suite à cette découverte, ils ont soumis à la base de données PubMLST [<http://pubmlst.org/paeruginosa>].

Suite à l'arbre phylogénétique (fig. 39), nous rapportons une petite épidémie des souches cliniques de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème, récupérées au niveau des services de réanimation du CHU de Annaba - Algérie, sur une période d'un an.

Nos résultats démontrent qu'il ya encore des méconnaissances sur l'épidémiologie de la MBL en Afrique. Le test de synergie EDTA - IMP qui est une méthode simple et rapide dans la détection des métallo-β-lactamases. Cette méthode pourrait être facilement mise en œuvre dans les laboratoires de microbiologie clinique, pour la surveillance des carbapénèmases. Afin de superviser l'émergence et la propagation des gènes codant pour des carbapénèmases, il est urgent d'envisager des dispositifs de surveillance nationale en Algérie.

Nos résultats mettent l'accent sur la diffusion dans le monde entier des gènes carbapénèmases VIM dans la multi-résistantes des souches cliniques de *P. aeruginosa*.

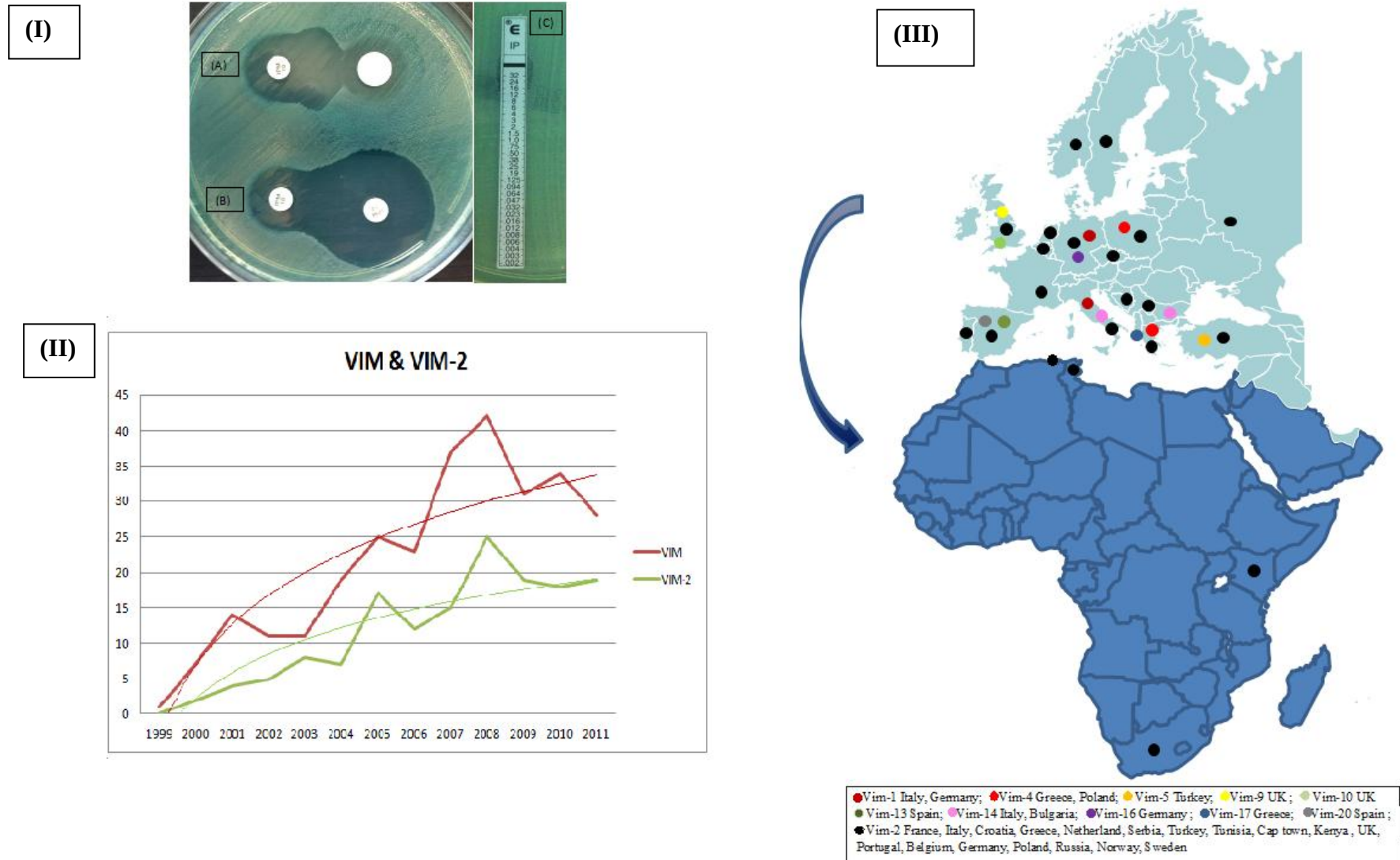


Fig. 40. (I) Test de l'EDTA-IMP. **(A)** Disque d'imipénème avec un disque vierge imprégné avec de l'EDTA. **(B)** deux disques d'imipénème l'un d'eux avec de l'EDTA. **(C)** MICs de l'imipénème d'une souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème VIM-2 positive.

(II): Nombre de citations trouvé dans PubMed de 1999 à 2011 en utilisant soit 'VIM' or 'VIM-2' chez *Pseudomonas aeruginosa*

(III): Comparaison de l'émergence des souches de *P. aeruginosa* productrice de VIM métallo-beta-lactamase entre l'Europe et l'Afrique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des bactéries de l'environnement. Elles sont très rares chez les sujets sains tandis que chez les sujets hospitalisés, elles peuvent atteindre des taux de 50% voir 60% des infections, surtout dans les services de réanimation.

Ce sont des microorganismes responsables de pathologies variées, fréquentes et parfois redoutables. Ce caractère redoutable des infections est dû en grande partie au pouvoir toxique de ces agents infectieux et à leur grande capacité de résistance aux antibiotiques.

Depuis plusieurs années, parmi les BGN-NF les plus incriminés dans les infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs, on retrouve *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Maints travaux sur l'émergence de ces deux espèces, en tant que pathogènes opportunistes majeurs, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites. Le plus souvent, les investigations menées au cours de ces épidémies ont identifié l'environnement des services de réanimation comme réservoir principal de contamination des patients. Saprophyte de l'environnement *P. aeruginosa* et *A. baumannii* peuvent survivre et se multiplier plusieurs mois sur des supports inertes ou humides (pour *P. aeruginosa*), voire même des solutions antiseptiques conservées trop longtemps.

Bien que la surveillance des infections aux bacilles à Gram négatif non fermentants en réanimation soit recommandée, peu d'informations sont disponibles car les études publiées sont principalement centrées sur la résistance de ces bactéries aux antibiotiques. Il est par ailleurs, difficile de comparer les taux d'incidence entre hôpitaux et services. C'est pour cela que les investigations épidémiologiques dans les unités de soins intensifs sont indispensables afin de contrôler l'émergence des ces espèces.

Les espèces *A. baumannii* et *P. aeruginosa* posent actuellement, un problème émergent de multi-résistance aux antibiotiques. Elles sont aussi dénommées sous la terminologie de BMR (Bactérie Multi-résistante), notamment la résistance aux β -lactamines. Au sein de cette famille d'antibiotiques, la résistance aux carbapénèmes et particulièrement l'imipénème est d'incidence croissante. Alors que cette molécule était considérée, il ya peu de temps, comme le traitement de choix des infections à *A. baumannii* et *P. aeruginosa* dans les services de réanimation.

Nous rapportons dans notre travail, l'analyse bactériologique des prélèvements émanant des services de réanimation du CHU de Annaba qui a permis l'isolement des souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa*, avec un profil de multi-résistance particulièrement à l'imipénème.

C'est une épidémie de résistance à l'imipénème, et on démontre que nos connaissances sont très limitées sur l'épidémiologie des métallo- β -lactamases (MBL) et les oxacillinases dans ce service.

Il existe des méthodes phénotypiques simples et peu coûteuses (test de synergie EDTA-IMP et le test de Hodge), pour détecter les carbapénèmases. Ces méthodes pourraient être facilement mises en œuvre dans les laboratoires de microbiologie clinique pour la surveillance de la résistance.

Par ailleurs, des mesures de contrôle devraient être envisagées rapidement afin d'instaurer un système de veille nationale, pour superviser l'émergence et la propagation des gènes codant pour des carbapénèmases.

Nos résultats mettent l'accent sur l'apparition de souches portant des gènes carbapénémase VIM chez *P. aeruginosa* et, des gènes carbapénèmases OXA-23 et OXA-58 dans chez *A. baumannii* multi-résistantes ce qui nous incite à mettre en place une stratégie permanente pour anticiper l'apparition de ce type de résistance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 2263-8.
- [2] Allegranzi B, Bagheri NS, Combescure C, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2011;377: 228-41.
- [3] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25: 3389-402.
- [4] Amazian K, Fendri C, Missoum MF, et al. Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25: 340-3.
- [5] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289: 321-31.
- [6] Avril JL, Tardivel R. [Bacterial complications of blood transfusions]. *Transfus Clin Biol* 1996;3: 43-9.
- [7] Baddour LM, Hicks DV, Tayidi MM, et al. Risk factor assessment for the acquisition of fluoroquinolone-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a community-based hospital. *Microb Drug Resist* 1995;1: 219-22.
- [8] Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, et al. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46: 3406-11.
- [9] Bakour S, Kempf M, Touati A, et al. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol* 2012;61: 1341-3.
- [10] Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST, et al. Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 1996;37: 1155-64.
- [11] Bergmans DC, Bonten MJ, van Tiel FH, et al. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* 1998;53: 1053-8.
- [12] Bergogne-Berezin E. The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp.: the need for control and new agents. *J Hosp Infect* 1995;30 Suppl: 441-52.
- [13] Bergogne-Berezin E. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Expert Opin Investig Drugs* 1997;6: 119-27.
- [14] Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002;50: 11-8.

- [15] Bert F, Lambert-Zechovsky N. Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care units and other wards. *J Antimicrob Chemother* 1996;37: 809-13.
- [16] Berthelot P, Grattard F, Mahul P, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 2001;27: 503-12.
- [17] Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, et al. [Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris)* 2005;53: 341-8.
- [18] Bertrand X, Blasco G, Belle E, et al. [*Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2003;22: 505-9.
- [19] Bertrand X, Thouverez M, Patry C, Balvay P, Talon D. *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2001;7: 706-8.
- [20] Bertrand X, Thouverez M, Talon D, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001;27: 1263-8.
- [21] Beyersmann J, Gastmeier P, Grundmann H, et al. Transmission-associated nosocomial infections: prolongation of intensive care unit stay and risk factor analysis using multistate models. *Am J Infect Control* 2008;36: 98-103.
- [22] Blanc DS, Nahimana I, Petignat C, et al. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30: 1964-8.
- [23] Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect* 1998;4: 242-7.
- [24] Bogaerts P, Rezende de CR, Roisin S, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2012;67: 1552-3.
- [25] Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, et al. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55: 349-54.
- [26] Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160: 1212-9.
- [27] Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 428-32.
- [28] Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56: 2214-5.
- [29] BRENNER (D.J.) KNRSJTeGGM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* . 2 ed. 2005.

- [30] Bryskier A. [Classification of beta-lactams]. *Pathol Biol (Paris)* 1984;32: 658-67.
- [31] Bryskier A. Antibacterial drug discovery and development--third international summit. 8-9 March 1999, Princeton, NJ, USA. *IDrugs* 1999;2: 414-7.
- [32] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39: 1211-33.
- [33] Castanheira M, Wanger A, Kruzel M, Deshpande LM, Jones RN. Emergence and clonal dissemination of OXA-24- and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains in Houston, Texas: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2008;46: 3179-80.
- [34] Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, et al. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66: 2053-6.
- [35] Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001;48: 839-52.
- [36] Changeur Nicolas. MC. Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides). 2009.
- [37] Chouchani C, Marrakchi R, Ferchichi L, El SA, Walsh TR. VIM and IMP metallo-beta-lactamases and other extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from environmental samples in a Tunisian hospital. *APMIS* 2011;119: 725-32.
- [38] Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, et al. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 710-4.
- [39] Cobben NA, Drent M, Jonkers M, et al. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. *J Hosp Infect* 1996;33: 63-70.
- [40] Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 756-8.
- [41] Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 2011;11: 381-93.
- [42] Corvec S, Caroff N, Espaze E, et al. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 2003;52: 629-35.
- [43] Corvec S, Poirel L, Espaze E, et al. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J Hosp Infect* 2008;68: 73-82.
- [44] Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51: 1530-3.

- [45] Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55: 947-53.
- [46] Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Perichon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54: 4389-93.
- [47] Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004;42: 5094-101.
- [48] Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004;42: 5644-9.
- [49] Da Silva GJ, Correia M, Vital C, et al. Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215: 33-9.
- [50] Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P. AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52: 557-62.
- [51] Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37: 544-6.
- [52] Dijkshoorn L, van AE, Shunburne L, et al. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect* 2005;11: 329-32.
- [53] Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51: 4209-10.
- [54] Dortet L, Legrand P, Soussy CJ, Cattoir V. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J Clin Microbiol* 2006;44: 4471-8.
- [55] Drissi M, Poirel L, Mugnier PD, Baba AZ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29: 1457-8.
- [56] Dubois V, Arpin C, Noury P, Quentin C. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46: 3624-6.
- [57] Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47: 3724-32.
- [58] Edgeworth JD, Treacher DF, Eykyn SJ. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27: 1421-8.

- [59] Eric Scholar. The Comprehensive Pharmacology. Repère médical . 2008.
- [60] Fagon JY, Chastre J, Vuagnat A, et al. Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. JAMA 1996;275: 866-9.
- [61] Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2003;51: 565-74.
- [62] Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. First identification of VIM-4 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect 2008;14: 289-90.
- [63] Fleteau C, Janvier F, Delacour H, et al. Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a patient returning from Serbia, France, 2012. Euro Surveill 2012;17.
- [64] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. Bull World Health Organ 2001;79: 780-90.
- [65] Floret N, Bertrand X, Thouverez M, Talon D. [Nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Exogenous or endogenous origin of this bacterium?]. Pathol Biol (Paris) 2009;57: 9-12.
- [66] Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis 2006;42: 692-9.
- [67] Garland SM, Mackay S, Tabrizi S, Jacobs S. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with a contaminated blood-gas analyser in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect 1996;33: 145-51.
- [68] Gilles Brucher. Infections nosocomiales et envirement hospitalier. 1998.
- [69] Girault C, Tamion F, Beduneau G. [Quality of care assessment and nosocomial pneumonia in the intensive care unit]. Rev Mal Respir 2006;23 Suppl 2: 4S27-43.
- [70] Habs H, Habs M. [Thermostable antigens of melanin producing *P. aeruginosa* strains]. Zentralbl Bakteriol Orig 1968;208: 283-8.
- [71] Hammami S, Gautier V, Ghazzi R, et al. Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. Clin Microbiol Infect 2010;16: 189-93.
- [72] Hammami S, Gautier V, Ghazzi R, et al. Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. Clin Microbiol Infect 2010;16: 189-93.
- [73] Hammami S, Ghazzi R, Saidani M, Ben RS. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in Tunisia. Tunis Med 2011;89: 638-43.
- [74] Hedge PJ, Spratt BG. Resistance to beta-lactam antibiotics by re-modelling the active site of an *E. coli* penicillin-binding protein. Nature 1985;318: 478-80.

- [75] Heritier C, Poirel L, Fournier PE, et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 4174-9.
- [76] Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. NHSN annual update: 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. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29: 996-1011.
- [77] Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 5035-8.
- [78] Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 1999;2: 38-55.
- [79] Hussenet C, Jaureguierry S, Robert J, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in three returning travelers evacuated from Algeria, Thailand, and Turkey after hospitalization in local intensive care units. *J Travel Med* 2011;18: 358-60.
- [80] Jacobson RK, Minenza N, Nicol M, Bamford C. VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* causing an outbreak in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2012;67: 1797-8.
- [81] Jennane S, Masmoudi A, Boudabous A, Fendri C. [Sensitivity of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics and disinfectants used in a Tunisian hospital milieu]. *Med Trop (Mars)* 1995;55: 255-7.
- [82] Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11: 868-73.
- [83] Jones RN, Deshpande LM, Bell JM, et al. Evaluation of the contemporary occurrence rates of metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant Gram-negative bacilli in Japan: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49: 289-94.
- [84] Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, et al. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55: 3929-31.
- [85] Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010;65: 2253-4.
- [86] Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect* 2008;14: 1102-11.
- [87] Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7: e31676.
- [88] Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39: 105-14.

- [89] Kettner M, Milosovic P, Hletkova M, Kallova J. Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates. *Infection* 1995;23: 380-3.
- [90] Kruger T, Szabo D, Keddy KH, et al. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: 4263-70.
- [91] Ktari S, Arlet G, Mnif B, et al. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 4198-201.
- [92] Ktari S, Mnif B, Znazen A, et al. Diversity of beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo-beta-lactamase in two Tunisian hospitals. *Microb Drug Resist* 2011;17: 25-30.
- [93] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010;10: 597-602.
- [94] Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38: 164-8.
- [95] La SB, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 2006;44: 827-32.
- [96] Lahsoun M, Boutayeb H, Zerouali K, Belabbes H, El MN. [Prevalence and in vitro antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter baumannii* strains in a Moroccan university hospital]. *Med Mal Infect* 2007;37: 828-31.
- [97] Larouche Geneviève. Les quinolones : des années soixante à aujourd'hui. *Pharmacothérapie théorique. Pharmacothérapie théorique* . Pharmactuel ed. 2001.
- [98] Lasheras A, Guisset O, Boulestreau H, et al. [Reservoirs and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit]. *Med Mal Infect* 2006;36: 99-104.
- [99] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43: 1584-90.
- [100] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43: 1584-90.
- [101] Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41: 4623-9.
- [102] Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 4485-91.

- [103] Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32: 475-80.
- [104] Lin YC, Sheng WH, Chen YC, et al. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35: 439-43.
- [105] Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8: 557-84.
- [106] Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001;47: 247-50.
- [107] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34: 634-40.
- [108] MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, et al. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J Infect Dis* 2000;181: 1180-4.
- [109] Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 3375-80.
- [110] Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 71-6.
- [111] Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64: 458-61.
- [112] Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: 3298-304.
- [113] Marchandin H, Jean-Pierre H, De CC, et al. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 213-6.
- [114] Marcos MA, Vila J, Jimenez de Anta MT. [Epidemiology of infections caused by *Acinetobacter baumannii*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11: 450-4.
- [115] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, et al. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 3322-7.
- [116] Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frere JM. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* 1998;330 (Pt 2): 581-98.
- [117] Matagne A, Misselyn-Bauduin AM, Joris B, et al. The diversity of the catalytic properties of class A beta-lactamases. *Biochem J* 1990;265: 131-46.

- [118] McMurry L, Petrucci RE, Jr., Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77: 3974-7.
- [119] Melano R, Corso A, Petroni A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2003;52: 36-42.
- [120] Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2009;63: 55-9.
- [121] Merkier AK, Catalano M, Ramirez MS, et al. Polyclonal spread of bla(OXA-23) and bla(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries* 2008;2: 235-40.
- [122] Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* 1997;24 Suppl 1: S46-S62.
- [123] Moubareck C, Bremont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 3579-81.
- [124] Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40: 2488-93.
- [125] Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010;16: 35-40.
- [126] Mussi MA, Limansky AS, Relling V, et al. Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single carO gene, encoding a major outer membrane protein channel. *J Bacteriol* 2011;193: 4736-48.
- [127] Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 1432-40.
- [128] Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43: 1281-4.
- [129] Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 1999;150: 317-22.
- [130] Nordmann P. [Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2003;22: 527-30.

- [131] Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998;42: 128-31.
- [132] Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1994;38: 104-14.
- [133] Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002;8: 321-31.
- [134] Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodriguez C, et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 2012;56: 1703-13.
- [135] Ouedraogo SM, Toloba Y, Badoum G, et al. [Epidemio-clinical aspects of adult acute bacterial pneumonia at Yalgado Ouedraogo University Health Center]. Mali Med 2010;25: 15-8.
- [136] Pai H, Kim J, Kim J, et al. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2001;45: 480-4.
- [137] Palleroni N. Genus I. *Pseudomonas*. 2 ed.: BRENNER (D.J.), KRIEG (N.R.), STALEY (J.T.) et GARRITY (G.M.) , 1894.
- [138] Park S. LKMYYSJSYJIKHSLYSCGT. Alterations of gyrA, gyrB, and parC and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. Osong Public Health and Research Perspectives 2011;2: 164-70.
- [139] Paton R, Miles RS, Hood J, et al. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 1993;2: 81-7.
- [140] Pechere JC, Kohler T. Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 1999;5 Suppl 1: S15-S18.
- [141] Pechere JC, Michea-Hamzhepour M, Kohler T. [Antibiotic efflux, a mechanism of multiple resistance in *Pseudomonas aeruginosa*]. Bull Acad Natl Med 1998;182: 599-612.
- [142] Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. Antimicrob Agents Chemother 2006;50: 399-400.
- [143] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21: 538-82.
- [144] Philippon A, Arlet G. [Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork!]. Ann Biol Clin (Paris) 2006;64: 37-51.
- [145] Pitout JD, Revathi G, Chow BL, et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. Clin Microbiol Infect 2008;14: 755-9.

- [146] Poirel L, Karim A, Mercat A, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J Antimicrob Chemother* 1999;43: 157-8.
- [147] Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52: 1613-7.
- [148] Poirel L, Marque S, Heritier C, et al. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 202-8.
- [149] Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 891-7.
- [150] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006;12: 826-36.
- [151] Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Plesiat P, Nordmann P. Naturally occurring Class A ss-lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 876-82.
- [152] Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2004;10: 12-26.
- [153] Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 479-87.
- [154] Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55: 5946-8.
- [155] Prashanth K, Badrinath S. Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. *Indian J Med Res* 2005;122: 408-18.
- [156] Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008;46: 1106-9.
- [157] Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 1633-41.
- [158] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20: 440-58, table.
- [159] RAHAL KBRT-MHBMMFKBAAA, Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 2012.
- [160] Rello J, Ausina V, Ricart M, et al. Risk factors for infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 1994;20: 193-8.

- [161] Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54: 466-70.
- [162] Rockstroh T. [Changes in the nomenclature of bacteria after the 8th edition of Bergey's Manual of the Determinative Bacteriology]. *Z Arztl Fortbild (Jena)* 1977;71: 545-50.
- [163] Rodriguez-Martinez JM, Poiriel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 4783-8.
- [164] Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010;16: 1699-701.
- [165] Rolinson GN. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* 1998;41: 589-603.
- [166] Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N, Vinas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res* 2004;35: 251-7.
- [167] Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2007;13: 1192-8.
- [168] SAIDANI M., BOUALLEGUE O., MIMOUNA F., BEN SALEM Y., MZOUGH R. Etat actuel de la résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii* = Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii*. *MHA* 2003;2003, vol. 15, no43, pp. 40-43 [4 page(s) (article)] (11 ref.): 40-3.
- [169] SAMOU FOTSO HAMEL SAID, **LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DANS LE SERVICE DE CHIRURGIE « B » DE L'HOPITAL DU POINT G.** 2005.
- [170] Samuelsen O, Buaro L, Toleman MA, et al. The first metallo-beta-lactamase identified in Norway is associated with a Tn1C-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 331-2.
- [171] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992;24: 104-8.
- [172] Sanschagrin F, Bejaoui N, Levesque RC. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42: 1966-72.
- [173] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49: 543-51.
- [174] Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 1998;47: 455-62.
- [175] Shakil S, Khan AU. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. *J Chemother* 2010;22: 324-7.

- [176] Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. *Indian J Med Res* 2007;126: 63-7.
- [177] Sohrabi N, Farajnia S, Akhi MT, et al. Prevalence of OXA-type beta-lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. *Microb Drug Resist* 2012;18: 385-9.
- [178] Sorin M, Segal-Maurer S, Mariano N, et al. Nosocomial transmission of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* following bronchoscopy associated with improper connection to the Steris System 1 processor. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22: 409-13.
- [179] Struelens MJ, Rost F, Deplano A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae bacteremia after biliary endoscopy: an outbreak investigation using DNA macrorestriction analysis. *Am J Med* 1993;95: 489-98.
- [180] Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 4362-4.
- [181] Sykes RB, Bonner DP, Bush K, Georgopapadakou NH, Wells JS. Monobactams--monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1981;8 Suppl E: 1-16.
- [182] Szabo D, Szentandrassy J, Juhasz Z, et al. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;7: 12.
- [183] Talon D. The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria. *J Hosp Infect* 1999;43: 13-7.
- [184] Talon D, Mulin B, Rouget C, et al. Risks and routes for ventilator-associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157: 978-84.
- [185] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24: 1596-9.
- [186] Thibault M, les infections nosocomiales l'importance d'un suivie epidemiologique et l'identification rapides des bacterie en cause. vol. These de doctorat en pharmacie, 2011.
- [187] Thomas J. New quinolones and the impact on resistance. *Drug Discovery Today*. 6 ed. 2006.
- [188] Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2003;53: 274-82.
- [189] Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, et al. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol* 2007;45: 199-205.
- [190] Touati A, Brasme L, Benallaoua S, et al. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60: 287-90.

- [191] Touati M, Diene SM, Racherache A, et al. Emergence of blaOXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40: 89-91.
- [192] Trautmann M, Bauer C, Schumann C, et al. Common RAPD pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from patients and tap water in a medical intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health* 2006;209: 325-31.
- [193] Trautmann M, Michalsky T, Wiedeck H, Radosavljevic V, Ruhnke M. Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22: 49-52.
- [194] Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, et al. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2006;12: 981-3.
- [195] Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;258: 72-7.
- [196] Turton JF, Woodford N, Glover J, et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006;44: 2974-6.
- [197] Valles J, Mariscal D, Cortes P, et al. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2004;30: 1768-75.
- [198] Van LM, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004;10: 684-704.
- [199] van MR, Willems R, Brimicombe R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. *J Clin Microbiol* 2009;47: 4096-101.
- [200] Vora S, Auckenthaler R. [What is the significance of extended spectrum betalactamases in clinical practice?]. *Rev Med Suisse* 2009;5: 1991-4.
- [201] Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21: 367-71.
- [202] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18: 306-25.
- [203] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57: 373-83.
- [204] Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2006;57: 1261-2.
- [205] Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51: 4022-8.

- [206] Wang SA, Levine RB, Carson LA, et al. An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20: 746-51.
- [207] Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 2000;184: 53-6.
- [208] Yardy GW, Cox RA. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contaminated urodynamic equipment. *J Hosp Infect* 2001;47: 60-3.
- [209] Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2002;40: 3798-801.
- [210] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 5046-54.
- [211] Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Nakamura S. Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34: 1273-5.
- [212] Yum JH, Yi K, Lee H, et al. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla(VIM-2) gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002;49: 837-40.
- [213] Zahar JR, Bille E, Schnell D, et al. [Extension of beta-lactamases producing bacteria is a worldwide concern]. *Med Sci (Paris)* 2009;25: 939-44.
- [214] Zhanel GG, Johanson C, Embil JM, et al. Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;3: 23-39.

Résumé

La résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif non fermentants est un problème de santé majeur dans les services de réanimation, et particulièrement la résistance aux carbapénèmes. Cette résistance est un problème récent et croissant dans de nombreux pays à travers le monde. Le but de notre travail a été d'étudier la résistance aux antibiotiques et leurs supports génétique sur une série de 64 souches, collectées de Novembre 2010 à Septembre 2011 dans les services de réanimation du CHU d' Annaba, Algérie.

L'identification des souches a été effectuée selon deux techniques : Api20NE et MALDI-TOF MS. L'antibiogramme a été réalisé par méthode de diffusion d'antibiotique sur gélose et les concentrations minimales inhibitrices par Etest. Les mécanismes de résistances aux antibiotiques ont été identifiés par techniques de biologie moléculaire (PCR, séquençage) et on a utilisé l'Ultraflex (MALDI-TOF) pour la détection rapide des carbapénémases.

Parmi les 64 souches isolés (30 *A. baumannii* et 34 *P. aeruginosa*), 24 souches *A. baumannii* et 17 souches *P. aeruginosa* ont été résistantes à l'imipénème avec des MIC_S élevées (12 à > 32 µg/ml).

Parmi les *A. baumannii*, 22 possèdent une carbapénémase de type oxacillinase *bla*_{OXA-23}, un isolat possède *bla*_{OXA-58} et un autre isolat possède les deux gènes au même temps. Et pour les BLSE, 13 possèdent le gène TEM-128.

Concernant, les souches de *P. aeruginosa*, 14 portes le gène *bla*_{VIM-2}, pour la première fois rapporté en Algérie, et positif au test de synergie EDTA- imipénème. Ces souches affiche nouvelle cassette d'intégron classe I portant le gène VIM-2 et comprend également le gène *aadB* et *aacA4*. Pour les BLSE seule trois souches étaient positifs au gène SHV-2.

On rapport une prévalence élevée de la résistance aux antibiotiques et particulièrement aux carbapénèmes. Ces résultats soulignent la diffusion des carbapénémase de type oxacillinase chez *A. baumannii*, et les métallo-β-lactamase des chez *P. aeruginosa*. Ce qui incite la mise en œuvre de politique de surveillance de la résistance aux antibiotiques

Mots clés : Réanimation, résistances aux antibiotiques, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, carbapénémases.

Abstract

Resistance to antibiotics in *Gram-negative non-fermenters* is a major health problem in intensive care units, especially resistance to carbapenems. This resistance is a recent and increasing problem in many countries worldwide.. The aim of our study was to study antibiotic resistance and genetic materials in a series of 64 strains collected from November 2010 to September 2011 from University Hospital of Annaba, Algeria.

Bacteria were identified using both API20NE commercial system and MALDI TOF mass spectrometry..The antibiotic susceptibility testing was performed using the disk diffusion method. Etest method was used to determine imipenem minimum inhibitory concentrations (MICs) from resistant isolates. The isolates were analyzed via microbiological tests for carbapenemase activities. Rapid method of carbapenem-resistant detection in all 24 clinical strains was detected using MALDI-TOF MS (Ultraflex) and Mechanisms of antibiotic resistance have been identified by molecular biology techniques (PCR, sequencing).

Among the 64 strains isolated (30 *A. baumannii* and 34 *P. aeruginosa*), 24 *A. baumannii* and 17 *P. aeruginosa* were resistant to imipenem MICs with high (12 to > 32 micrograms / ml) and also carbapenem-resistant *A. baumannii* strains disappearance of the peak. Among these strains, 22 harbour *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene, one isolate harbors *bla*_{OXA-58} carbapenemase gene and one carries both *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} carbapenemase encoding genes. and 13 strain the BLSE have TEM-128.

Among 17 *P. aeruginosa* strains, 14 harbored a VIM-2 class I integron that also included an *aadB* and *aacA4* cassette this is a novel cassette in Algeria. regarding ESBLs we note only 3 strains.

In this study, we report a high prevalence of antibiotic-resistant and particularly to carbapenems. These results emphasize the dissemination of carbapenemase types oxacillinase in *A. baumannii*, and metallo-beta-lactamase in *P. aeruginosa*. What makes the implementation of policy monitoring antibiotic resistance.

Keywords: multidrug resistant, carbapenemase, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, intensive care unit.

المخلص

مقاومة المضادات الحيوية عند الباسيليات اقزام سيلبي غير متأكد تعتبر مشكلة صحية اولية في اقسام الانعاش و خاصة المقاومة لكرباينام (carbapénèmes) و تعتبر هذه المشكلة حديثة و متزايدة في العديد من الدول عبر العالم. والهدف من عملنا هذا هو دراسة المقاومة للمضادات الحيوية و حواملها الجنية (وراثية)، على سلسلة ذات 64 سلالة مجمعة خلال مدة زمنية من نوفمبر 2010 الى سبتمبر 2011 من طرف اقسام الانعاش التابعة للقطاع الصحي بعنابة، الجزائر.

تم التعرف على السلالات بطريقتين Api20NE و MALDI-TOF MS . وتم التوصل الى قابلية الحساسية عن طريق بث المضادات الحيوية على الجيلوز و الادنى للتركيزات المثبطة عن طريق Etest. ان اليات المقاومة المضادات الحيوية اكتشفت عن طريق اليات بيولوجية جزيئية (PCR, séquençage) كما ستعملنا/الترافلكس (MALDI-TOF) الكشف السريع للكرباينيماز.

من بين 64 سلالة معزولة، (30 *A. baumannii* et 34 *P. aeruginosa*) ، 24 سلالة *A. baumannii* و 17 سلالة *P. aeruginosa* اظهروا مقاومة للايميبينام ب MIC_S مرتفع (12 à > 32 µg/ml) . من بين *A. baumannii* ، 22 يحتوي على الكرباينيماز من فصيلة oxacillinase *bla*_{OXA-23} . واحد منها يحتوي على *bla*_{OXA-58} و الآخر يحتوي على جنينين في نفس الوقت وبنسبة لل BLSE ، 13 منها تحتوي على الجين TEM-128 .

في ما يخص بكتيريا *P. aeruginosa*، 14 منها حاملة *bla*_{VIM-2} ، ذكرت لأول مرة في الجزائر. تعتبر اجابية لاختبار السينرجي EDTA- imipénème . هذه البكتيريا تبين كاسيت d'intégron classe I جديدة حاملة VIM-2 وتحتوي أيضا على جنينين *aadB* et *aacA4* . أما بالنسبة لل BLSE ثلاثة سلالات فقط كانت اجابية للجين SHV-2.

نبين معدل مرتفع بانتشار المقاومة للمضادات الحيوية و خاصة الى الكرباينام. هذه النتائج تبين انتشار الكرباينيماز من صنف أكساسيليناز عند *A. baumannii* و الميتالوبيتالكتاماز عند *P. aeruginosa* ، مما يستلزم وضع سياسة مراقبة للمقاومة للمضادات الحيوية.

كلمات البحث : الانعاش ، المقاومة للمضادات الحيوية، *A. baumannii* ، *P. aeruginosa* ، الكرباينيماز.

ANNEXES

Annexes

Liste des articles

Article 1 : Emergence of blaOXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria.

Article 2 : Dissemination of 1 class I integron carrying VIM-2 carbapenemase gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from intensive care unit of University Hospital of Annaba, Algeria

Article 1 : Emergence of bla_{OXA-23} and bla_{OXA-58} carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

Volume 40, Issue 1, July 2012, pages 89–91



Letter to the Editor

Emergence of bla_{OXA-23} and bla_{OXA-58} carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria

Sir,

Acinetobacter baumannii is an important opportunistic pathogen that is rapidly evolving towards multidrug resistance and is responsible for nosocomial infections, especially in Intensive Care Units (ICUs) [1]. Extensive use of antimicrobial agents within hospitals has contributed to the emergence of multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* strains that exhibit resistance to a wide range of antibiotics. Carbapenems have potent activity against *A. baumannii* and, until recently, were often used to treat infections caused by MDR *A. baumannii* isolates [1].

In recent years, the emergence and spread of carbapenem resistance has been reported and it is mainly attributed to the production of carbapenemases, mainly class D carbapenem-hydrolysing oxacillinases, especially the bla_{OXA-23}-like, bla_{OXA-24}-like and bla_{OXA-58}-like gene products [1]. Outbreaks of carbapenem-resistant *A. baumannii* strains have been documented in diverse geographical areas, including the USA, South America, Europe and the Far East [1], but little information is available from North Africa. The aim of this study was to characterise the carbapenemase-encoding genes in imipenem-resistant clinical isolates of *A. baumannii* from the University Hospital of Annaba, Algeria.

A total of 24 imipenem-resistant *A. baumannii* clinical isolates (minimum inhibitory concentrations ranging from 12 µg/mL to >32 µg/mL by Etest) were isolated between November 2010 and September 2011 from 24 patients (3 children and 21 adults) in two ICUs in the University Hospital of Annaba. Among these 24 patients, 6 (25%) died, including 1 child and 5 adults. Carbapenemase activity was also confirmed for the 24 isolates using the recently described matrix-assisted laser desorption ionisation–time of flight mass spectrometry (MALDI–TOF) assay with disappearance of the peak at 300 m/z after 4 h of incubation [2] (Fig. 1). All strains were positive for bla_{OXA-51} and ISAba1 genes. Real-time polymerase chain reaction (PCR) and standard PCR results for carbapenemase-encoding genes showed that 22 of the 24 isolates harboured a bla_{OXA-23} gene, 1 strain harboured a bla_{OXA-58} gene and 1 strain harboured both bla_{OXA-23} and bla_{OXA-58} genes. None of strains harboured bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{OXA-24}, bla_{KPC} or bla_{NDM-1} genes.

Finally, genotyping by comparison of recA sequences with the genotypes previously deposited in the MLST Pasteur Web Site

(<http://www.pasteur.fr/mlst>) revealed the existence of eight genotypes. Genotype rec A-27 was the most frequent, with 15 (71.4%) of 21 clinical isolates from adults belonging to this unique genotype, which was likely clonal (data not shown).

In this study, we report *A. baumannii* clinical isolates resistant to carbapenems recovered recently in Annaba, Algeria, over a 10-month period. A previous study conducted between March 2003 and January 2004 in nine university hospitals in the Mediterranean area (four from Algeria, two from Tunisia and three from France) showed that the percentage of imipenem-resistant *A. baumannii* strains differed among countries and ranged from 5.2% in Algeria to 28.8% in Tunisia [3]. The high prevalence found in the current study was likely due to an outbreak in the Hospital of Annaba, since the majority of the isolates came from this hospital in a short period (November 2010 to September 2011) and had the same genotype, at least in the adult ICU. Of 24 patients in this study, 6 (25%) eventually died, confirming the high level of attributable mortality due to *A. baumannii* nosocomial infections [1].

In this study, the main molecular support of resistance to carbapenems was the presence of bla_{OXA-23} carbapenemase-encoding genes, along with the coexistence of bla_{OXA-58} for one strain. In Africa, OXA-23-producing *A. baumannii* strains have been isolated from South Africa, Libya, Egypt and Tunisia, and, to the best of our knowledge, only one OXA-23-producing *A. baumannii* isolate was reported from a patient in Algeria in 2004 [4]. Two of the strains in the current study harboured a bla_{OXA-58} gene, including one strain that contained both bla_{OXA-58} and bla_{OXA-23}. The bla_{OXA-58} gene has been reported worldwide, including in 12 *A. baumannii* clinical isolates in Tlemcen, Algeria, in 2008 [5]. However, the coexistence in a strain of both bla_{OXA-23} and bla_{OXA-58} genes has never been reported in Algeria. This may suggest that the epidemiology of carbapenemase-encoding genes has changed in Algeria, with the bla_{OXA-23} gene being the most prevalent carbapenemase-encoding gene circulating in this country.

Finally, in this study we used the recently described new MALDI–TOF MS method for detection of carbapenem-resistant isolates and confirm that this method was rapid and accurate for detection of carbapenem-resistant *A. baumannii* and could be used as a routine technique for detection of carbapenemase activity [2].

In conclusion, these results re-emphasise the worldwide dissemination of OXA carbapenemase genes in MDR clinical isolates of *A. baumannii* and the emergence and rapid dissemination of carbapenem resistance due to the bla_{OXA-23} gene in Algeria.

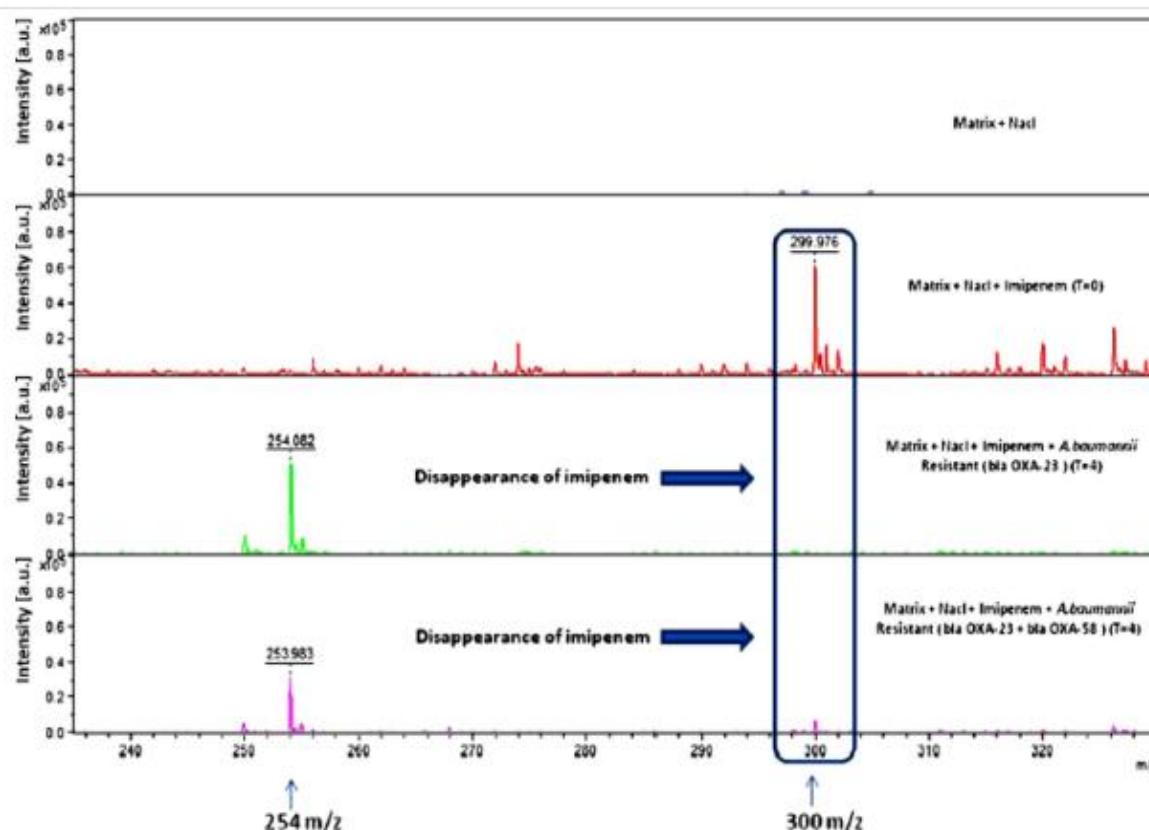


Fig. 1. Mass spectra of the imipenem hydrolysis assay with two carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. The x-axis represents the mass per charge (m/z) in Daltons, and the y-axis shows the relative intensity [arbitrary units (a.u.)].

Acknowledgment

The authors thank Linda Hadjadj for technical assistance.

Funding: This work was partly funded by Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:105–14.
- [2] Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7:e31676.
- [3] Amzian K, Fendri C, Missoum MF, Bouzouaia N, Rahal K, Savey A, et al. Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:340–3.
- [4] Mugnier PD, Poiriel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010;16:35–40.
- [5] Drissi M, Poiriel L, Mugnier PD, Baba Ahmed Z, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1457–8.

Meriem Touati ^{a,b}

^a Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE CNRS-IRD, UMR 6236, Méditerranée Infection, Faculté de médecine et de pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France

^b Département de biochimie, Université BADJI MOKHTAR, Annaba 23000, Algeria

Seydina M. Diene

Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE CNRS-IRD, UMR 6236, Méditerranée Infection, Faculté de médecine et de pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France

Abdelkarim Racherache

Service de réanimation, CHU Annaba, Algeria

Mazouz Dekhil

Laboratoire central de microbiologie, CHU Annaba, Algeria

Abdelghani Djahoudi

Laboratoire de microbiologie, Faculté de médecine, Université BADJI MOKHTAR, Annaba, Algeria

Jean-Marc Rolain ^{*}

Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE CNRS-IRD, UMR 6236, Méditerranée Infection, Faculté de médecine et de pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 4 91 32 43 75; fax: +33 4 91 38 77 72.

E-mail addresses: jean-marc.rolain@univ-amu.fr, jean-marc.rolain@univmed.fr (J.-M. Rolain)

12 March 2012

Article 2 : Dissemination of 1 class I integron carrying VIM-2 carbapenemase gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from intensive care unit of University Hospital of Annaba, Algeria.

Dissemination of a Class I Integron Carrying VIM-2 Carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital Intensive Care Unit in Annaba, Algeria

Meriem Touati, Seydina M. Diene, Mazouz Dekhil,
Abdelghani Djahoudi, Abdelkarim Racherache and
Jean-Marc Rolain
Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57(5):2426. DOI:
10.1128/AAC.00032-13.
Published Ahead of Print 4 March 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://aac.asm.org/content/57/5/2426>

These include:

REFERENCES

This article cites 18 articles, 10 of which can be accessed free
at: <http://aac.asm.org/content/57/5/2426#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Dissemination of a Class I Integron Carrying VIM-2 Carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital Intensive Care Unit in Annaba, Algeria

Meriem Touati,^{a,b} Seydina M. Diene,^a Mazouz Dekhil,^c Abdelghani Djahoudi,^d Abdelkarim Racherache,^e Jean-Marc Rolain^a

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes (URMITE), CNRS-IRD, UMR 6236, Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France^a; Département de Biochimie, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria^b; Laboratoire Central de Microbiologie, CHU de Annaba, Annaba, Algeria^c; Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria^d; Service de Réanimation, CHU d'Annaba, Annaba, Algeria^e

Over the last decade, the increase of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* has been due mostly to impermeability because of OprD loss and the production of metallo- β -lactamases (MBL), including those of the IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM-1, FIM-1, and NDM families (1–4); also, active efflux and serine carbapenemases may contribute to carbapenem resistance in *P. aeruginosa* in some cases. VIM-1 was reported in the Mediterranean area in 1997 in a clinical isolate of *P. aeruginosa* in Verona, Italy (5), and in a clinical isolate of *Pseudomonas mosselii* isolated in 1994 in Genoa, Italy (6). A VIM-2 variant appeared in Marseille, France, in 1996 (7). VIM-2 has now spread as the predominant MBL variant among *P. aeruginosa* in all European Mediterranean countries (1), but in North Africa, the presence of VIM-2 has been reported only recently in Tunisia (2, 8, 9). Here we report the first molecular characterization of VIM-2-producing *P. aeruginosa* clinical isolates from Algeria that harbored a novel class I integron that also contained two gene cassettes encoding resistance to aminoglycosides (*aadB* and *aacA4*).

A total of 17 nonreplicate imipenem-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates (imipenem MIC, >8 $\mu\text{g/ml}$, as determined by the Etest) recovered from December 2010 to September 2011 in a

surgical intensive care unit at the University Hospital of Annaba, Algeria, were screened by PCR for the presence of MBL-encoding genes using primers previously described (10–12). Antibiotic susceptibility testing was performed using disk diffusion with the breakpoints and according to the guidelines of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM) (www.sfm-microbiologie.org), and results are summarized in Table 1. An imipenem-EDTA synergy test (13) was positive for 14 out of 17 strains that were PCR positive for VIM-2 carbapenemase using the universal primers VIM-all-F (5'-TGGTCTACATGACC GCGTCT-3') and VIM-all-R (3'-CGACTGAGCGATTTGTGTG-5'), with an expected PCR size of 766 bp. The characterization of class I integrons reported previously (11) showed a novel class I

Published ahead of print 4 March 2013

Address correspondence to Jean-Marc Rolain, jean-marc.rolain@univ-amu.fr.

M.T. and S.M.D. contributed equally to this work.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00032-13

TABLE 1 Phenotypic and genotypic features of the 17 imipenem-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates^a

Strain	Date of isolation (day/mo/yr)	Patient age	Sex	Source	IMP MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Resistance phenotype								VIM-2 production	Sequence type
						TIC	TCC	TZP	CAZ	GEN	CIP	FOS	COL		
1	15/12/2010	42 yr	M	Bronchial aspirate	12	R	R	R	R	R	S	S	S	+	ST1420
2	15/12/2010	18 yr	F	Blood	32	R	R	R	R	R	S	S	S	+	ST1420
3	28/12/2010	18 mo	M	Bronchial aspirate	12	R	R	R	R	R	S	S	S	+	ST162
4	25/02/2011	2 mo	M	Bronchial aspirate	8	R	R	R	R	R	R	R	S	+	ST1420
5	27/02/2011	7 yr	M	Bronchial aspirate	16	R	R	R	R	R	R	R	S	+	ST1420
6	08/03/2011	7 days	M	Bronchial aspirate	32	R	R	R	R	S	S	R	S	+	ST1420
7	22/03/2011	57 yr	M	Urinary catheter	12	R	R	R	R	R	R	S	S	+	ST1420
8	23/03/2011	43 yr	M	Urinary catheter	32	R	R	R	R	S	S	R	S	+	ST1420
9	18/04/2011	35 yr	M	Urine	12	R	R	R	R	S	S	R	S	+	ST1420
10	25/05/2011	7 yr	M	Pus	16	R	R	R	R	R	S	R	S	+	ST1420
11	19/06/2011	46 yr	M	Urine	16	R	R	R	R	S	R	S	S	+	ST1420
12 ^b	22/06/2011	58 yr	F	Bronchial aspirate	32	R	R	R	R	R	S	S	S	–	ST1175
13 ^c	22/07/2011	40 yr	M	Bronchial aspirate	32	R	R	R	R	S	S	R	S	–	ST1420
14	18/08/2011	54 yr	M	Wound	16	R	R	R	R	R	S	S	S	+	ST1420
15	27/08/2011	5 yr	M	Wound	12	R	R	R	R	S	S	R	S	+	ST1420
16 ^d	10/09/2011	10 yr	M	Urine	16	R	R	R	R	R	R	R	S	–	ST654
17	27/08/2011	45 yr	M	Wound	12	R	R	R	R	R	S	S	S	+	ST1420

^a CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; FOS, fosfomycin; GEN, gentamicin; TCC, ticarcillin-clavulanic acid; TIC, ticarcillin; TZP, piperacillin-tazobactam; M, male; F, female; R, resistant; S, susceptible. MICs were determined by the Etest.

^b Contains a 529CGA-to-TGA mutation, leading to a stop codon in the *oprD* gene.

^c Exhibits a 193TGGG-to-TG:A deletion, leading to a stop codon in the *oprD* gene.

^d Contains a 757TCG-to-TAG mutation, leading to a stop codon in the *oprD* gene.

integron that harbored the VIM-2 gene associated with two gene cassettes encoding aminoglycosides resistance (*aadB* and *aacA4*). However, the molecular investigation of the remaining three strains using primers previously described (3) revealed chromosomal mutations that created premature stop codons in the *oprD* gene. Complete multilocus sequence typing (MLST) (14) revealed that the 17 strains belong to 4 different sequence types (ST), including ST162 (one isolate), ST654 (one isolate), ST1175 (one isolate), and a new ST, ST1420 (14 isolates), recently submitted to the PubMLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) from China (January, 2013).

To the best of our knowledge, in North Africa, VIM-2-MBL-producing *P. aeruginosa* isolates have been reported only in Tunisia (8, 9, 11). VIM-2-producing *P. aeruginosa* clinical isolates have been reported in other countries in Africa, including 1 from a Hungarian tourist who was hospitalized in Egypt (15), 1 from a single patient who was transferred to Norway after being hospitalized in Ghana (16), 57 recovered in 2006 and 2007 in Kenya (17), and 15 from South Africa (18).

Our results demonstrate that national surveillance should be urgently implemented in Algeria to monitor and control the emergence and spread of carbapenemase-encoding genes.

Nucleotide sequence accession numbers. The full sequence of the class 1 integron has been deposited in the GenBank database under accession number [JX120362](#).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Linda Hadjadj and Maxime Pit for technical assistance. We thank American Journal Experts for English corrections.

We have no conflicts of interest to declare.

This work was partly funded by CNRS.

REFERENCES

- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11:381–393.
- Hammami S, Boutiba-Ben BI, Ghazzi R, Saidani M, Amine S, Ben RS. 2011. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn. Pathol.* 6:106.
- Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodriguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, Moya B, Zamorano L, Suarez C, Pena C, Dominguez MA, Moncalian G, Oliver A, Martinez-Martinez L. 2012. Alterations of *OprD* in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1703–1713.
- Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini GM. 2013. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:410–416.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. 1999. Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1584–1590.
- Giani T, Marchese A, Coppo E, Kroumova V, Rossolini GM. 2012. VIM-1-producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, predating known VIM-producing index strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:2216–2217.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:891–897.
- Ktari S, Mnif B, Znazen A, Rekik M, Mezghani S, Mahjoubi-Rhimi F, Hammami A. 2011. Diversity of beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo-beta-lactamase in two Tunisian hospitals. *Microb. Drug Resist.* 17:25–30.
- Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, Bouallegue O, Boujaafar N, Nordmann P. 2009. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64:458–461.
- Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. 2011. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37:544–546.
- Hammami S, Gautier V, Ghazzi R, Da CA, Ben-Redjeb S, Arlet G. 2010. Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional *blaSHV2a* carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:189–193.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:673–679.
- Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. 2002. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 40:3798–3801.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 42:5644–5649.
- Szabo D, Szentandrassy J, Juhasz Z, Katona K, Nagy K, Rokusz L. 2008. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 7:12. doi:10.1186/1476-0711-7-12.
- Samuelsen O, Buaro L, Toleman MA, Giske CG, Hermansen NO, Walsh TR, Sundsfjord A. 2009. The first metallo-beta-lactamase identified in Norway is associated with a TnIC-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:331–332.
- Pitout JD, Revathi G, Chow BL, Kabera B, Kariuki S, Nordmann P, Poirel L. 2008. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:755–759.
- Jacobson RK, Minenza N, Nicol M, Bamford C. 2012. VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* causing an outbreak in South Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1797–1798.

Tab. 18. Résistance phénotypique et génotypique des 17 *P. aeruginosa*

<i>P. aergi</i>	age	Sexe	Date du prélèvement	Imipenem MICs	Phénotype IMP	Test EDTA	Gène VIM-2	ST	Nouvelle cassette d'integron portant le gène VIM-2 qui code pour une MBL	Gène Shv-2
1	39	F	Pus	2	S	-	-	-	-	-
2	50	M	Pus	0.75	S	-	-	-	-	-
3	42	M	Aspiration trachéale	12	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	+
4	41	F	Sang	32	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
5	64	M	Aspiration trachéale	12	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
6	35	F	Aspiration trachéale	0.75	S	-	-	-	-	-
7	59	M	Pus	1	S	-	-	-	-	-
8	38	F	Aspiration trachéale	0.75	S	-	-	-	-	-
9	44	M	Aspiration trachéale	8	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	+
10	18	F	Aspiration trachéale	0.75	S	-	-	-	-	-
11	7	M	Aspiration trachéale	16	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
12	34	F	Aspiration trachéale	0.75	S	-	-	-	-	-
13	73	M	Aspiration trachéale	32	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
14	27	F	Urine	1	S	-	-	-	-	-
15	57	M	Sonde urinaire	12	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
16	43	F	Sonde urinaire	1	S	-	-	-	-	-
17	43	M	Sonde urinaire	32	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	+
18	71	M	Sonde urinaire	0.38	S	-	-	-	-	-
19	35	M	Urine	12	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
20	12	M	Aspiration trachéale	1	S	-	-	-	-	-
21	51	M	Plaie	1	S	-	-	-	-	-
22	7	M	Pus	16	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
23	73	F	Aspiration trachéale	0.38	S	-	-	-	-	-
24	46	M	Sonde urinaire	16	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
25	32	M	Sang	0.38	S	-	-	-	-	-
26	58	F	Aspiration trachéale	32	R ^a	-	-	ST162	-	-
27	54	F	Aspiration trachéale	0.38	S	-	-	-	-	-
28	40	M	Aspiration trachéale	32	R ^b	-	-	ST1175	-	-
29	49	M	Aspiration trachéale	0.75	S	-	-	-	-	-
30	54	M	Plaie	16	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
31	45	M	Plaie	12	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
32	10	M	Sonde urinaire	16	R ^c	-	-	ST654	-	-
33	45	M	Plaie	12	R	+	+	ST1420	Class 1 integron - <i>bla</i> VIM-2 – <i>aadB</i> - <i>aac4</i> '	-
34	54	M	Pus	0.50	S	-	-	-	-	-