



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

These En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat EN MICROBIOLOGIE

Option: MICROBIOLOGIE APPLIQUE

Thème

**Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables
d'infections respiratoires basses**

Presentée par: M^{lle}. Abir RAMOUL

Membres de Jury:

Directeur de thèse :	Pr Mazouz DEKHIL	Université d'Annaba
Présidente de Jury :	Pr Djamila GACEMI-KIRANE	Université d'Annaba
Examinatrice:	Pr Nafissa ABBACI BOUTEFNOUCHET	Université d'Annaba
Examineur :	Pr Mekki AIDAOUI	Université d'Annaba
Examineur :	Pr Djamel Eddine BENOURETH	Université de Guelma
Examinatrice :	MC _A Zoulikha OUCHENANE	Université de Constantine

Année universitaire: 2013/201

REMERCIEMENT

Je tiens à remercier très sincèrement

Mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Mazouz DEKHIL**, chef du laboratoire de Microbiologie du CHU Dr Dorban Annaba, de m'avoir ouvert les portes du laboratoire, pour la confiance que vous m'accordez en acceptant de diriger ce travail, pour le temps que avez consacré, pour votre disponibilité, vos conseils tout au long de ce travail. Auprès de vous j'ai beaucoup appris, vous m'avez toujours encouragé à progresser.

Madame **Djamila GACEMI-KIRANE**, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, je la remercie aussi pour son soutien tout au long de mon cursus universitaire. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et reconnaissances.

Madame **Nafissa ABBACI BOUTEFNOUCHET**, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, je suis très sensible à l'honneur que vous me faites, en acceptant à juger cette thèse. Soyez assurée de ma sincère gratitude et remerciement.

Monsieur **Mekki AIDAOU**, Professeur en maladies infectieuses à l'hôpital Dr Dorban Annaba, qui m'a fait l'honneur d'analyser ce travail, je vous suis particulièrement reconnaissante.

Monsieur **Djamel Eddine BENOUARETH**, Professeur à l'université de Guelma, qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de soutenance de thèse et d'examiner ce travail, je le remercie également de me consacrer de son temps et d'avoir accepté de se déplacer.

Madame **Zoulikha OUCHENANE**, Professeur à l'Hôpital militaire régional universitaire de Constantine pour l'honneur qu'elle m'a fait de sa participation à mon jury de thèse, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, et d'avoir accepté de se déplacer. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance et de tous mes remerciements pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail.

Mes vives remerciements s'adressent également à :

Tout le personnel du laboratoire CHU Dr Dorban Annaba spécialement **Dr Kamel Amoura, Dr Sabrina Amiri, Dr Nassima Djehmi**, pour leurs conseils, aide et disponibilité.

Madame le Professeur **Ilhem Boutiba-Ben Boubaker** chef du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Charles, Tunis, Tunisie, qui m'a accueilli dans son laboratoire pour éventuelles techniques en biologie moléculaire, sous la direction de **Dr Samia Hammami** que je remercie vivement pour sa disponibilité, encouragement et complicité.

Monsieur le Professeur **Jean Marc Rolain**, qui m'a permis de rejoindre son équipe à l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, Faculté de pharmacie, Marseille, France, pour la finalisation de mes recherches en biologie moléculaire, soyez assuré de ma sincère gratitude et de mes remerciements.

Monsieur le Professeur **Abdellatif Boudabous** et le Docteur **Karim Ben slama**, qui ont été les premiers à m'ouvrir leurs portes du laboratoire LMBA (laboratoire de Microbiologie et de Biomolécules actives), faculté des Sciences d'El Manar Tunis. Tunisie, auprès d'eux j'ai beaucoup appris.

Je tiens à remercier mes très chers parents. Je leur exprime ma profonde reconnaissance et gratitude pour, leur confiance, leur financement soutien moral inconditionnel ainsi que pour leurs sacrifices, disponibilité et encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur.

Je remercie également mes sœurs pour leur complicité et dévouement, mes beaux-frères pour leur aide et conseils ainsi que mes neveux et toute ma famille. Je leur dédie cette thèse.

Merci à tous mes amis et collègues, 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

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie 1 : Revue bibliographique

1-Rappel anatomique 3

2-Définition et manifestation clinique 5

1-Pneumonie 5

2-Bronchite aiguë 5

3-Exacerbation aiguë de la bronchite chronique 6

4-les suppurations pleuro-pulmonaires 6

3- les agents étiologiques responsables d'infection respiratoire basse..... 6

3.1 Les virus 6

3.2 Les bactéries responsables sont 7

4- Prélèvements bactériologiques nécessaire au diagnostic bactériologique des IRB 7

4-1 Prélèvements sous fibroscope 7

4-2Prélèvements sans fibroscope 8

4-3 Autres prélèvements 11

5-Chapitre I : Etude bactériologique des entérobactéries responsables des infections respiratoires basses 13

5-1- Etude des entérobactéries 13

5-1.1Définition 13

5-1.2Taxonomie 13

5-1.3- Habitat 15

5-1.4-Caractères morphologiques	15
5-1.5-Caractères cultureux	16
5-1.6Caractères biochimiques	16
5-1.7Caractères antigéniques	18
5-1.8-Pouvoir pathogène.....	18
5-2- Sensibilité aux antibiotiques	19
5-2.1Les bêta-lactamines (β -lactamines)	19
5-2 .1.1-Structure et classification.....	19
5-2.1 .2-Mécanisme d'action des β -lactamines.....	23
5-2.1.2Mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries	24
5-2.1.2.1Imperméabilité.....	24
5-2.1.2.2Excrétion par des systèmes d'efflux.....	25
5-2.1.2.3Modification des PLP	25
5-2 .1.2 .4 Production de β -lactamases	25
5-2 .1.2 .4 1- Définition et mode d'action des β -lactamases	25
5-2.1 .2 .4 1.2- Origine et évolution β -lactamases	26
5-2 .1.2 .4 1.3- Classification	27
5-2.1 .2 .4 1.3-1- La classification d'Ambler	27
5-2.1 .2 .4 1.3-2- La classification de Bush, Jacoby et Medeiros	27
5-2.1 .2 .4 1.4- β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	29
5-2.1 .2 .4 1.4.1- β -lactamases de type OXA (OXACILLINASE)	32
5-2 .1.2 .4 1.5-Les Métallo-bêta-lactamases	33
5-2.2 -Résistance aux aminoglycosides	34
5-2.2.1-Mécanisme de résistance	34
5-2.3Phénotype de résistance naturelle chez les entérobactéries aux antibiotiques	34

<u>6-Chapitre II : Etude bactériologique des bacilles à Gram négatif non fermentaires responsables des infections respiratoires basses</u>	35
6-1. Définition.....	35
6-2. Taxonomie.....	35
6-2.1. Habitat.....	35
6-2.2 Classification.....	36
6-3. Les caractères bactériologiques.....	36
6-3.1. Les caractères morphologiques.....	36
6-3.2. Les caractères culturels.....	36
6-3.3. Type respiratoire.....	37
6-4. Etudes des principaux genres impliqués dans les infections respiratoire basses.....	38
6-4.1- Généralité.....	38
6-4.1.1 Le genre <i>Acinetobacter</i>	38
6-4.1.2 Le genre <i>Pseudomonas</i>	39
6-4.2 Sensibilité aux antibiotiques.....	39
6-4.2.1 Résistance enzymatique aux β -lactamines.....	40
6-4.2.1.1 β -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	40
6-4.2.1.2 β -lactamases à spectre étendu à activité carbapénemase.....	41
6-4.2.2 Résistance non enzymatique aux β -lactamines.....	43

Partie 2 : Matériel et méthode

I- Le profil bactériologique et épidémiologique des infections respiratoires basses.....	44
1. Lieu et période d'étude.....	44
2. Objectif.....	44
3. Critères d'inclusion.....	44
4. Critères de non inclusion.....	44
5. Source de données.....	44

II-Etude bactériologique	45
1-Prélèvement bactériologique	45
2-Techniques bactériologique	45
2.1-Etude phénotypique	45
2.3-Etude moléculaire	45
3- Protocoles bactériologiques	46
3.1-Etude phénotypique	46
3.1.1-Isolement	46
3.1.2- Identification bactérienne	47
3.1.2.1-API système	47
3.1.2-2-La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex)	48
3.1.3- Etude de la sensibilité aux antibiotiques	52
3.1.3.1- Antibiogramme par diffusion des disques selon le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [CA-SFM]	52
3.1.3.2- Détermination des concentrations minimales inhibitrices par méthode de dilution en milieu gélosé	57
3.1.3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) Par E- test	59
3.2- Etude moléculaire	59
3.2.1-Recherche des gènes codant pour les β -lactamases de classe A d'Ambler	59
3.2.1.1-Polymerase chainreaction (PCR) standard	60
3.2.1.2- Electrophorèse sur gel d'agarose	61
3.2.1.3-Séquençage	64
3.2.2. Recherche des gènes codants pour les carbapénemase par PCR	65
3.2.2.1-Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel	65
3.2.2.2-Polymerase chainreaction (PCR) standard	67
3.2.2.3 Séquençage	69
3.2.3 -Etude de la diversité clonale par Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	70

Partie 3 : Résultats et discussion

1-Répartition des souches bactériennes selon leur isolement	73
2-Etude phénotypique	75
2.1-Identification bactérienne	75
2.2-Etude de la sensibilité aux antibiotiques	76
2.2.1-Antibiogramme par diffusion des disques sur un milieu gélosé	76
2.2.2-Détermination des concentrations minimales inhibitrices par méthode de dilution en milieu gélosé.....	82
2.2.3-Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test	82
3-Etude moléculaire	86
3.1 Recherche des gènes codant pour les β -lactamases de classe A d'Ambler	86
3.2-Recherche des gènes codants pour les carbapénemase par PCR	90
3.3-Sequençage	95
3.4-Typage moléculaire par <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	95
3.4.1- Entérobactérie	95
3.4.2- <i>Acinetobacter baumannii</i>	98
Discussion	101
Conclusion et prospectives	115

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAC : acétyltransférases

ADH : arginine dihydrolase

ADN : acides désoxyribonucleique

ANT : adényltransférase

APH : phosphotransférase

ARN : acide ribonucleique

AT : Aspiration trachéale à l'aveugle

BET : bromure d'éthidium

BGN : Bacilles à Gram négatif

BLSE : bêta-lactamases à spectre élargie

BMR : Bactéries multi-résistantes

BTP : Brosse télescopique protégé

CA-SFM : société française de microbiologie

CMI : concentrations minimales inhibitrices

C3G : céphalosporine de troisième génération

ddNTP : didésoxynucléotides

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

H₂S : hydrogène sulfuré

IRB : Infection respiratoire basse

IVRI : Infections des voies respiratoires inférieures

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

LDC : lysine décarboxylase

LPS : lipo-polysaccharide

MALDI-TOF-MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight mass spectrometry

MBL : Métallo-bêta-lactamases

MH : Muller Hinton

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

PDP : Prélèvements distaux protégés

PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis

PHB : polybétahydroxybutyrate .

PLP : protéines liant la pénicilline

PSM : poste de sécurité microbiologique

RPM : Rotation par minute

TBE: Tris-Borate-EDTA

TFA : Acide TriFluorocétique

TSA : Trypto-Caseine Soja

TSR : Tamplate Suppression Reagent

USI : Unités de soins intensifs

UV : ultra violet

CT : Cycle threshold

VP : Voges-Proskauer

LISTE DES FIGURES

Figure N° 1: Appareil respiratoire de l'être humain

Figure N°2 : Schéma d'un brosseage télescopique protégé sous fibroscopie bronchique. L'agrandissement montre l'expulsion du bouchon de polyéthylène-glycol et le prélèvement bronchique par la brosse introduite à travers un système de double cathéter.

Figure N°3 : Représentation des principales classes des β -lactamines selon la nature du noyau contenu dans leur structure de base

Figure N°4 : Mécanisme d'action des β -lactamines (<http://www.antiinfectieux.org>)

Figure N° 5. Mécanisme d'inactivation des β -lactamines (<http://www.antiinfectieux.org>).

Figure N° 6 : Cathéter de prélèvement protégé distal dans un tube à essais

Figure N°7 : Identification des souches bactériennes par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Figure N°8: Inoculateur multipoint de type appareil de Steers automatique

Figure N°9: Principe de la Polymerase chain reaction (PCR) standard

Figure N°10 : Répartition des bactéries selon le Gram

Figure N°11 : Répartition des prélèvements selon le pourcentage d'isolement

Figure N°12 : Répartition des entérobactéries selon les espèces

Figure N°13 : Test de double disque pour confirmation de BLSE chez une souche *E. coli*

Figure N° 14 : Pourcentage de résistance des *S. aureus* aux antibiotiques

Figure N° 15: teste de screening de *staphylococcus aureus*

Figure N°16: Détermination des CMI par méthode de dilution en milieu solide

Figure N°17 : CMI par E-test Imipinème : (I) E-test imipinème d'une souche d'*A. baumannii* résistante (II) E-test imipénème d'une souches *A. baumannii* sensible, CT : colistine ; IMP : imipénème

Figure N°18 : Profil de migration par électrophorèse des produits de PCR de *bla_{SHV}*, M: marqueur de taille 1000 pb DNA Ladder (Promega), puits 1 : contrôle positif

Figure N°19: Profil de migration par électrophorèse des produits de PCR de *bla_{CTX-M}* . M: marqueur de taille 1000 pb DNA Ladder (Promega), puits 1 : contrôle positif

Figure N°20 : Profil de migration par électrophorèse des produits de PCR des gènes *bla_{TEM}* . M: marqueur de taille 1000 pb DNA Ladder (Promega), puits 1 : contrôle positif

Figure N°21 : Amplification du gène *bla_{OXA-51}* par Polymerase Chain Reaction (PCR) standard, M : marqueur de taille 1000pb DNA ladder (Promega), CP : contrôle positif

Figure N°22: Amplification du gène *bla_{OXA-23}* par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

Figure N°23 : Amplification du gène *bla_{OXA-23}* par Polymerase Chain Reaction (PCR) standard, M : marqueur de taille 1000pb DNA ladder (Promega), CP : contrôle positif

Figure N° 24: Amplification du gène *bla_{NDM-1}* par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

Figure N° 25 : Amplification du gène *bla_{NDM-1}* par Polymerase Chain Reaction (PCR) en standard, M : marqueur de taille 1000pb DNA ladder (Promega), T+ : témoin positif, T- : témoin négatif.

Figure N° 26 : Amplification du gène *bla_{OXA-58}* par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

Figure N° 27: Amplification du gène *bla_{OXA-24}* par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

Figure N°28: Electrophorèse en champs pulsé des ADN génomiques de 19 souches d'entérobactérie

Figure N°29: Eléctrophorese en champs pulse des ADN génomique de 23 souches d'*A. baumannii*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°1: Principaux groupes d'entérobactéries isolés en pathologie humaine

Tableau N°2 : Identification des genres d'entérobactéries selon la mobilité et les caractères biochimiques

Tableau N°3 : Classification des β -lactamases d'après Ambler et Bush [Bonnet, 2006]

Tableau N°4 : Origine des différents groupes de CTX-M [Canton & Coque, 2006]

Tableau N°5 : Caractères biochimiques du genre *Acinetobacter*

Tableau N°6 : Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau N°7 : Interprétation des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF

Tableau N°8 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries

Tableau N°9: Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp.*

Tableau N° 10 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus sp.*

Tableau N° 11: Caractéristiques des amorces utilisées pour la recherche par PCR des gènes de résistance aux β -lactamines

Tableau N° 12 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR en temps réel

Tableau N° 13 : Amorces utilisées pour les PCR en temps réel

Tableau N° 14 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard

Tableau N° 15: Séquences d'amorce utilisées dans PCR standard dans cette étude

Tableau N°16 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big-Dye

Tableau N°17: Programme de l'amplification de la PCR Big-Dye

Tableau N° 18: Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF

Tableau N°19 : Profil de résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Tableau N° 20 : Profil de résistance des *A. baumannii* et *P. aeruginosa* aux antibiotiques

Tableau N°21 : Etude des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes souches d'entérobactéries

Tableau N°22 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices des souches d'*Acinetobacter baumannii*

Tableau N° 23: Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches d'entérobactérie

Tableau N°24 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches d'*A. baumannii*

Introduction

Introduction

La découverte des antibiotiques, notamment la pénicilline en 1928 a sans doute été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle. L'utilisation de ces derniers depuis les années 1940 a considérablement réduit le taux de morbidité et de mortalité lié aux maladies infectieuses [Van et al., 2011].

Cependant, leur utilisation à grande échelle a également conduit à l'émergence de la résistance aux antibiotiques. Les premières bactéries résistantes ont été identifiées dès les années 1940, avec notamment l'émergence de *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline dès 1947, soit seulement quatre ans après l'utilisation à grande échelle de cet antibiotique [Hall et al., 1998]. A partir des années 1950, de nombreux antibiotiques ont été découverts ou synthétisés et pour chaque nouvelle classe développée, nous avons assisté par la suite à l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance, entraînant la diffusion de bactéries pathogènes de plus en plus difficiles à traiter, comme ce fut le cas de la méticilline, mise sur le marché en 1961 suivi de la découverte de *S. aureus* résistants à l'ampicilline G en 1962, suivi par l'émergence des entérobactéries résistantes à cet antibiotique en 1964, puis des céphalosporines mise sur le marché en 1980 suivi de l'émergence d'entérobactéries résistantes en 1981 [Van et al., 2011].

L'âge d'or de la recherche pharmaceutique sur les antibiotiques a duré jusqu'aux années 1980, expliquant le fait qu'à cette époque, la résistance aux antibiotiques, bien que connue et largement répandue, ne représentait pas encore une menace. Dans les années 2000, selon les données de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies infectieuses causées par les bactéries multi-résistantes (BMR) ont été à l'origine de 25% des décès dans le monde entier, dont 50% provenaient des pays en voie de développement. En Europe en 2007, 400000 infections ont été causées par les BMR dont 25000 décès ont été liés à ces bactéries qui n'ont pas pu être traitées faute d'antibiotiques efficaces. Le coût annuel de traitement de ces infections étant estimé à 1.5 milliard d'euros [Buch et al., 2011].

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, particulièrement les entérobactéries, les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Acinetobacter* représentent un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Les infections nosocomiales causées par ces BMR ont non seulement conduit à une augmentation de la mortalité, de la morbidité, et du coût de traitement, mais aussi continuent de mettre en danger la vie des patients surtout immunodéprimés en milieu hospitalier. Il est évident de noter que l'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques a longtemps contribué à

Introduction

l'émergence et à la large diffusion des déterminants de la résistance « résistome », défini comme étant tous les gènes impliqués directement ou indirectement dans la résistance aux agents antimicrobiens [Diene et al., 2013].

Face à cette préoccupation mondiale qui est l'émergence des BMR pathogènes résultant d'une part de l'utilisation abusive des antibiotiques et de la mobilisation des gènes de résistance à partir de réservoirs préexistants, et d'autre part de la capacité des bactéries à échanger du matériel génétique dans des conditions de pressions d'antibiotiques, il est primordial de conduire des études d'épidémiologie moléculaire afin de comprendre et de contrôler la diffusion et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, parmi les stratégies de surveillance, particulièrement dans le domaine de la microbiologie, nous assistons ces dernières années au développement de nouvelles techniques de surveillance de la résistance aux antibiotiques impliquant d'importantes ressources financières et intellectuelles à travers le monde. Cette surveillance demeure actuellement prioritaire pour les sociétés scientifiques et celles de santé publique, afin de détecter les épidémies dans leur stade précoce. Le développement de ces nouveaux outils de surveillance en temps réel, combiné au développement de nouveaux outils et logiciel bioinformatiques a révolutionné le monde de la recherche microbiologique et représente aujourd'hui le meilleur moyen de prendre en charge le problème de la résistance aux antibiotiques particulièrement chez les bacilles à Gram négatif.

C'est dans cette optique que ce projet de thèse a comme objectif principal d'évaluer le taux de résistance et le support génétique de résistance aux antibiotiques mais aussi l'étude d'épidémiologie moléculaire des bactéries responsables des infections respiratoires basses en utilisant divers outils de biologie moléculaire.

Ainsi ce manuscrit s'articule autour de trois parties, la première partie présentera une synthèse bibliographique sur les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques et sur les données épidémiologiques des bactéries responsables des infections respiratoires basses, puis dans une seconde partie, nous détaillerons les outils méthodologiques utilisés avant d'exposer la troisième partie qui comporte les résultats de notre travail et leur discussion.

1-Rappel anatomique

Les voies aériennes inférieures sont représentées par l'arbre bronchique dont l'extrémité proximale est représentée par la trachée qui se subdivise en deux branches souches, chacune pénétrant le poumon droit et gauche. Cet appareil est protégé par la cage thoracique.

A l'intérieur des poumons, chaque bronche se ramifie en bronches secondaires et tertiaires, elle-même se subdivise ultérieurement en de plus petit conduit, les bronchioles qui s'achèvent par des sacs aériens appelés alvéoles.

Les poumons sont enveloppés par une fine membrane, appelée la plèvre qui est constituée de deux feuillets l'un viscéral et l'autre pariétal ; le premier tapisse les poumons et le deuxième la paroi thoracique. Une cavité virtuelle existe entre les deux feuillets dont la fonction d'assurer la lubrification de l'interface, en diminuant le frottement entre le poumon et la cage thoracique.

A l'état normal l'espace pleural contient une faible quantité de liquide stérile, évaluée chez le sujet sain entre 1 et 20 ml (Figure N° 1).

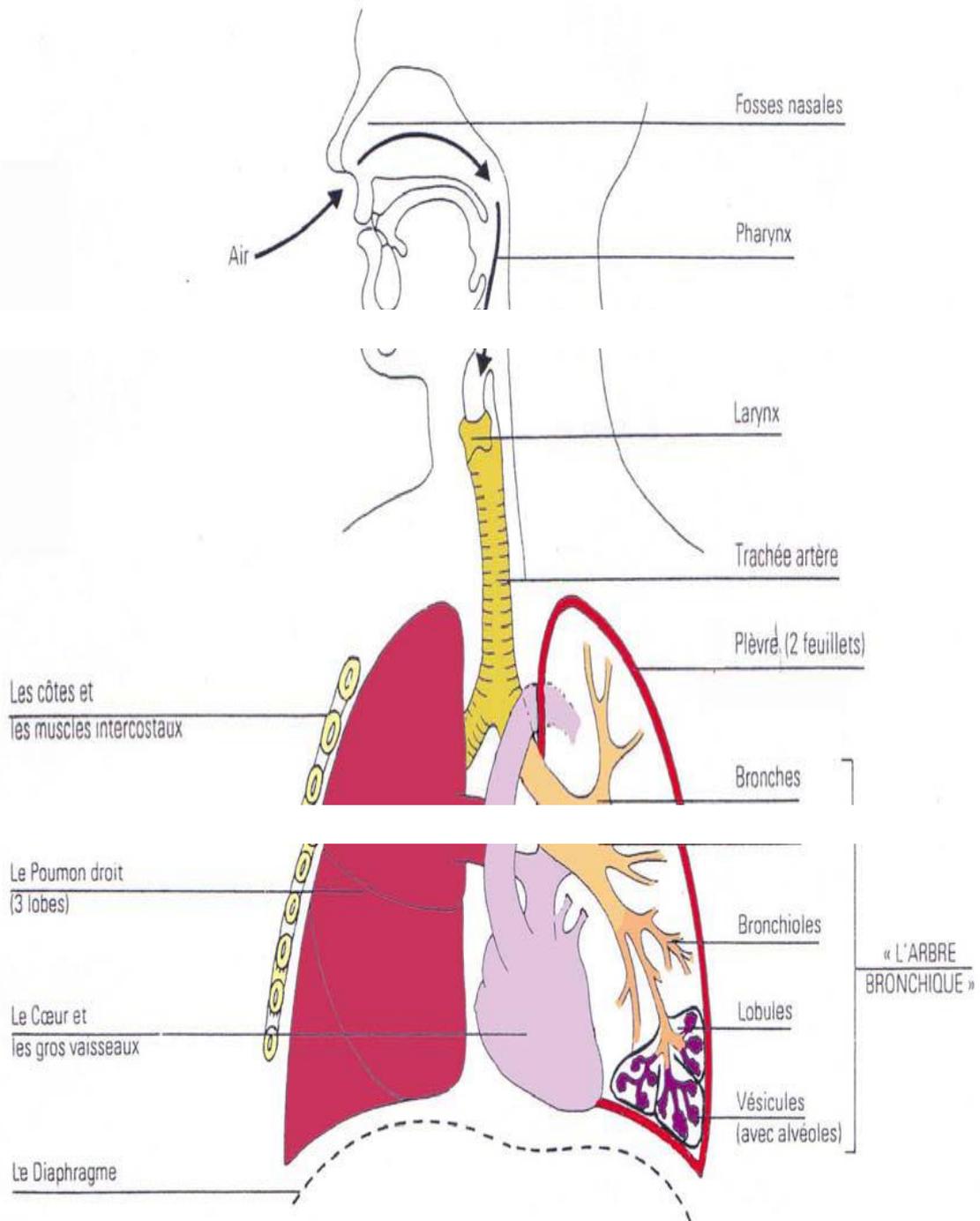


Figure N° 1: Appareil respiratoire de l'être humain

2-Définition et manifestations cliniques

Les infections respiratoires basses (IRB) sont définies comme les infections de l'étage sous glottique de l'appareil respiratoire, elles se manifestent par des bronchites, pneumonies ou pneumopathies et des suppurations pleuropulmonaire.

Bien que la pneumonie et d'autres infections des voies respiratoires inférieures (IVRI) sont particulièrement fréquentes chez les patients en unités de soins intensifs (USI), en raison de la forte association avec la ventilation mécanique.

Quatre extrinsèques facteurs de risque d'IVRI comprennent l'intubation endotrachéale, la ventilation mécanique, la micro-aspiration de l'oropharynx, et les facteurs intrinsèques liés à chaque patient qui comprennent la maladie sous-jacente, la présence de l'immunosuppression et selon l'origine communautaire ou nosocomiale de l'infection [Humphreys et al., 2010].

Chez l'enfant notamment le nourrisson la bronchiolite est de loin la plus fréquente, elle est d'origine virale, la pneumonie ou pneumopathie est le plus souvent bactérienne.

1-La pneumonie : la pneumonie est définie comme une infection du parenchyme pulmonaire d'évolution aigue, elle est dite communautaire si elle est acquise en milieu extrahospitalier ou si, à l'hôpital, elle survient au cours des 48 premières heures du séjour. Il s'agit d'une affection commune et potentiellement grave 15% de mortalité globale dans une série hospitalière française [Rakotoson et al., 2010 ; Fagon et al., 2001 ; Fagon et al., 1993]. L'agent causal reste méconnu dans plus de 50% des cas, le pneumocoque est le plus fréquent, *Haemophilus influenzae* à une fréquence plus faible avec *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, les légionnelles sont impliquées dans moins de 5% des cas en dehors des épidémies.

2-La bronchite aigue : La bronchite aigue est définie par une inflammation aigue des bronches et des bronchioles chez un sujet sain, elle débute par une toux douloureuse non productive puis associée avec une expectoration avec parfois une fièvre. La bronchite aigue est de prédominance d'origine virale, ne nécessite pas en principe d'antibiothérapie, *Mycoplasma pneumoniae* est rarement incriminée [Rakotoson et al., 2010].

Revue bibliographique :

3-Exacerbation aigue de la bronchite chronique : la bronchite chronique est définie par l'association d'une toux et d'une expectoration trois mois par an pendant au moins deux années consécutives. Elle est caractérisée par l'augmentation du volume de l'expectoration, de sa purulence et/ou de la dyspnée. Les bactéries les plus fréquentes en cause sont : *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella catarrhalis* [Ramdani-Bouguessa & Rahel 2005].

4-les suppurations pleuropulmonaires :

4-1 L'abcès du poumon associe un tableau de pneumopathie aigue fébrile avec douleur thoracique et altération importante de l'état général. L'expectoration purulente est rarement massive et abondante mais plutôt fractionnée.

4-2 La pneumopathie aigue suppurée correspond à l'apparition de foyer de nécrose au sein d'un foyer pneumonique étendu, pas ou insuffisamment traité ou traité par une antibiothérapie inadéquate.

4-3 Les suppurations pleurales (pleurésies purulentes ou empyèmes), ce sont des infections de la cavité pleurale, caractérisées par la présence entre les deux feuillets de la plèvre, d'un épanchement franchement épais ou crémeux ou d'un liquide simplement louche, voire claire mais renferment toujours des polynucléaires plus ou moins altérés, caractéristiques du pus.

Les agents étiologiques les plus incriminés sont les anaérobies dans plus de la moitié des cas. D'autres bactéries sont impliquées, notamment les entérobactéries, *Staphylococcus*, *Streptocoques*, *Haemophilus* et pneumocoques.

3- les agents étiologiques responsables d'infection respiratoire basse

3.1 **Les virus :** sont responsables dans 75% des cas d'infections respiratoires, les virus responsables sont:

-Myxovirus : responsables de formes épidémiques, virus respiratoire syncytial qui occupe la première place chez les enfants, virus influenzae A et B et virus parainfluenzae 1, 2, 3,4.

-Adenovirus : responsables des cas sporadiques.

Revue bibliographique :

- Herpetoviridae : responsables de la pneumopathie extensive grave chez l'immunodéprimé dont le cytomégalovirus est l'agent le plus important suivi de l'herpes simplex virus et du virus varicelle zona [Ramdani-Bouguessa & Rahel, 2005].

3.2 Les bactéries responsables sont:

- IRB communautaire : $\geq 90\%$ des infections bactériennes sont dues à des bactéries suivantes :

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Legionella pneumophila*
- *Chlamydiae pneumoniae*

-IRB nosocomiale : ces infections sont polymicrobiennes dans un tiers des cas. Les bacilles à Gram négatif sont responsables dans 60% des cas et les staphylocoques dans 40% des cas [Humphreys et al., 2010].

4- Prélèvements bactériologiques nécessaires au diagnostic bactériologique des IRB

Il existe de nombreuses techniques et variantes pour réaliser les prélèvements microbiologiques broncho-pulmonaires, quelque soit la méthode utilisée, leurs indications dépendent de l'état du patient et du germe suspecté. Il est important de rappeler que les prélèvements doivent être transportés rapidement pour analyse au laboratoire de microbiologie avant toute prise d'antibiotique [Allaouchiche & Geissler, 2000].

4-1 Prélèvements sous fibroscope

La fibroscopie est un examen bien toléré malgré son retentissement sur l'hématose, il suffit de ventiler le patient en oxygène pure et de supprimer une éventuelle pression expiratoire positive. Diagnostic non invasif des pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique [Fangio., et al 2002].

4-1-1 Brosse télescopique protégé (BTP)

Le but de ce prélèvement est d'effectuer un brossage des sécrétions bronchiques dirigé sous fibroscope dans le territoire suspect tout en évitant la contamination par les voies

Revue bibliographique :

aériennes supérieure (double cathéter télescopique obturé par un bouchon de polyéthyléneglycol).

4-1-1 Lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Le LBA est obtenu par injection et réaspiration de sérum physiologique stérile à travers le chenal du fibroscope. Sa réalisation impose le positionnement bloqué du fibroscope dans une bronche de 3^{ème} ou 4^{ème} ordre du segment pulmonaire suspect. La quantité de liquide instillée varie suivant les auteurs de 100 à 400 ml (souvent 150 ml en trois fraction de 50 ml) . Après chaque instillation, le liquide est réaspiré. La première fraction aliquote recueillie est analysée séparément et ne doit pas servir à la culture quantitative. Le reste du liquide (au minimum 5 ml) permettra d'effectuer notamment : le comptage du nombre total des cellules et des cellules épithéliales (contamination oropharyngée si > 1%).

Le rendement diagnostique de cette méthode est comparable à celui de la BTP. Au seuil de 10⁴ UFC/ml. La sensibilité du LBA est en général supérieure à celle de la BTP, pour une spécificité moindre. En plus d'un bon rendement dans le diagnostic des pneumopathies non bactériennes, l'avantage du LBA est l'examen direct qui permet d'obtenir immédiatement la suspicion de pneumopathie (pourcentage de bactérie intracellulaire et une orientation thérapeutique (coloration de Gram). Certains auteurs ont proposé des méthodes de diagnostic rapide dans le LBA. On peut citer le dosage d'endotoxine, l'utilisation d'une sonde nucléique spécifique de *Staphylococcus aureus*, la recherche des fibres d'élastine. Ces méthodes peuvent permettre, par leur rapidité, de débiter précocement une antibiothérapie adaptée.

4-2Prélèvements sans fibroscope

Il s'agit de méthodes simples, de faible coût, facilement répétable et sans contre-indication.

4-2-1 Prélèvements distaux protégés (PDP)

A noter que cette technique peut se faire en présence ou en absence de fibroscope. Après aspiration des sécrétions bronchiques, un double cathéter protégé par un bouchon de polyéthyléneglycol est introduit dans les bronches jusqu'à être en butée (Figure N° 2).

Il est retiré d'un centimètre et le cathéter interne est mis en position. A l'aide d'une seringue de 10 ml. 2 à 3 aspirations sont pratiquées puis le cathéter interne est mis dans sa protection et le matériel retiré. L'extrémité du cathéter externe est coupée. Le cathéter interne

Revue bibliographique :

est rincé avec 1ml, de sérum physiologique qui est recueillis dans un tube stérile ainsi que l'extrémité distale de ce cathéter qui est coupée. Après vortexage et dilution au 1/10, le prélèvement est mis en culture. Au seuil de 10^4 UFC/ml, le rendement diagnostique semble équivalent à celui du LBA et donc comparable à celui de la BTP (un peu moins spécifique et un peu plus sensible).

Une autre procédure s'apparente à un mini LBA par l'injection au travers du cathéter interne de 20 ml de sérum physiologique qui sont réaspirés. L'augmentation du risque de contamination (comptage des cellules épithéliales) peut être compensée par la possibilité d'effectuer un examen direct.

4-2-2 Aspiration trachéale à l'aveugle (AT)

Il s'agit du recueil de sécrétions respiratoires réalisé à l'aide d'une sonde liée à une trachée stérile et à un système d'aspiration. Ce prélèvement est proximal et limité à la trachée et aux bronches principales. C'est l'examen qui possède la plus grande sensibilité pour le diagnostic des pneumopathies sous ventilation mécanique. En effet la physiopathologie veut que les micro-organismes évoluent de proche en proche à partir de la trachée avant d'être éventuellement responsables de ces infections. Si les résultats de la culture sont exprimés de façon quantitative, la spécificité augmente au détriment de la sensibilité. Pour certains auteurs, au seuil de 10^5 ou 10^6 UFC/ml, le rendement diagnostique serait comparable à celui de la BTP.

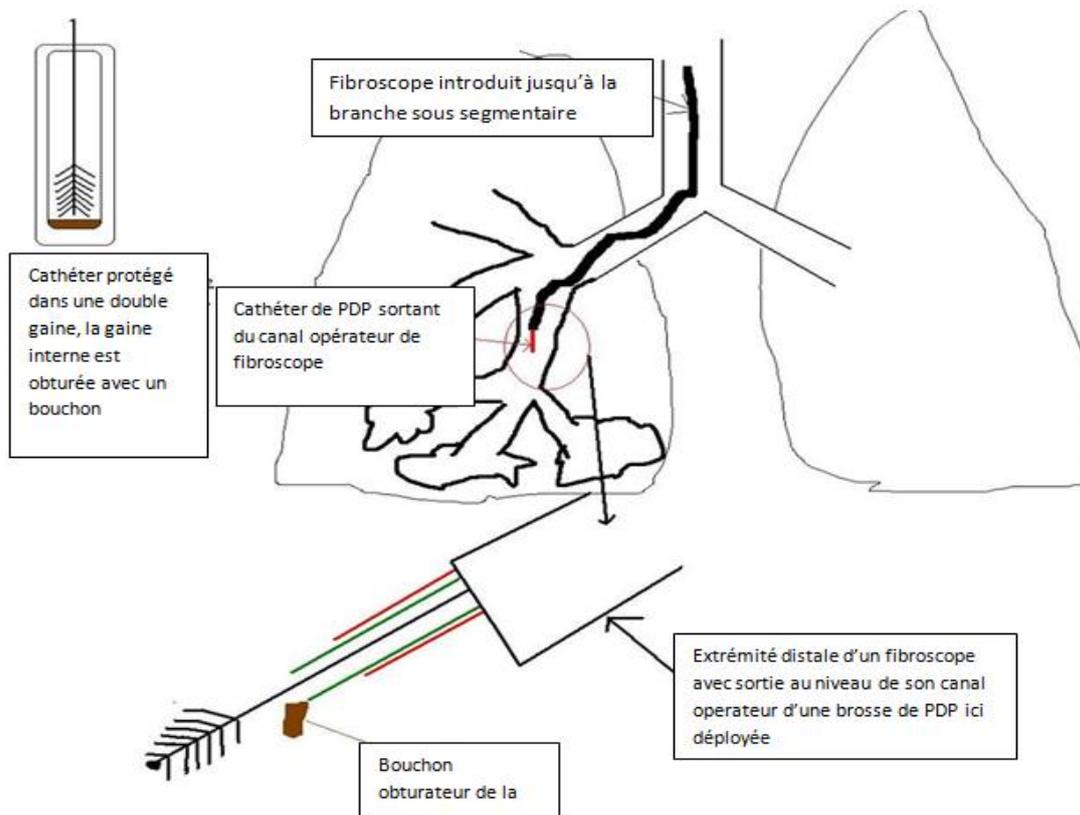


Figure N° 2 : Schéma d'un brossage télescopique protégé sous fibroscopie bronchique.
L'agrandissement montre l'expulsion du bouchon de polyéthylène-glycol et le
prélèvement bronchique par la brosse introduite à travers un système de double
cathéter.

Revue bibliographique :

4-3 **Autres prélèvements** [Allaouchiche & Geissler, 2000; Ramdani-Bougoussa & Rahel, 2005]

4-3-1 La ponction trans-trachéale

Le prélèvement se fait à l'aide d'une aiguille placée de façon à former 45° par rapport à la surface cervicale désinfectée chez un sujet allongé, le cou dégagé en mettant un support sous les épaules. Un cathéter lié à une seringue est introduit à travers l'aiguille et les sécrétions ainsi aspirées. D'indication limitée bien que ces prélèvements soient de grande qualité microbiologique, cependant des complications peuvent survenir tel que : hémorragie et surinfection, elle est indiquée dans les pneumopathies nosocomiales chez les immunodéprimés.

4-3-2 La ponction transthoracique à l'aiguille fine

Cette méthode est actuellement d'utilisation exceptionnelle dans les pneumopathies nosocomiales à cause des risques d'hémorragie et de pneumothorax, elle consiste à introduire une aiguille à travers le thorax en passant par la plèvre et aspirer le tissu pulmonaire. Une radiographie est nécessaire auparavant à fin de localiser la partie infectée à prélever. Cette méthode est contre indiquée chez les insuffisants respiratoires.

4-3-3 La ponction pleurale

La réaction pleurale n'est présente que dans 20% lors des pneumopathies à pneumocoque et dans 80% dans les pneumopathies à Staphylocoques [Ramdani- Bougoussa & Rahal, 2005]. Elle est d'une grande valeur diagnostique. L'empyème peut être isolé ou associé à une suppuration pulmonaire.

Le prélèvement est recueilli par ponction à l'aiguille après une désinfection de région costale à l'aide d'une solution antiseptique.

Revue bibliographique :

4-3-4 L'aspiration nasopharyngée

Elle est indiquée pour le diagnostic de la coqueluche. Elle est réalisée par l'intermédiaire d'une sonde nasopharyngée liée à une seringue. Cette technique est aussi utilisée pour le diagnostic de la pneumopathie néonatale à *Chlamydia trachomatis*.

4-3-5 Ecouvillonnage de l'oropharynx postérieur

Cette méthode est réalisée en frottant l'écouvillon au niveau de l'oropharynx postérieur pour la recherche directe de *Chlamydia psittaci* et *Chlamydia pneumoniae*.

4-3-6 L'hémoculture

Elle est indiquée devant une fièvre $\geq 39^{\circ}$ accompagnant une pneumonie. Le prélèvement est effectué aux pics thermiques après désinfection de la surface à prélever et des mains des préleveurs et en dehors de toute antibiothérapie. Le rendement de ces hémocultures est faible puisque seule 20 à 30% des pneumonies sont bactériémiques [Ramdani- Bouguessa & Rahel; 2005].

4-3-7 Le sérum

Il faut prélever deux sérums à un intervalle de deux ou trois semaines. Cette sérologie est valable pour la recherche d'anticorps anti-chlamydiae, anti-mycoplasme et anti-légionelles.

Les deux sérums seront congelés avant d'être traités en même temps.

5-Chapitre I : Etude bactériologique des entérobactéries responsables des infections respiratoires basses

5-1- Etude des entérobactéries:

5-1.1 Définition :

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif (BGN) définis classiquement par les critères suivants (certains genres ne répondent pas à tous ces critères) [Freney & Croze 2007]:

- Bacilles souvent mobiles par une mobilité péritriche ou immobiles.
- Non exigeants, leur culture est facile sur milieux ordinaires.
- Dépourvues de cytochrome oxydase.
- Possèdent une nitrate réductase, enzyme qui réduit les nitrates en nitrites.
- Aero-anaérobies facultatifs (capables de pousser en présence de dioxygène).
- Dégradent le glucose par une voie fermentaire avec ou sans production de gaz

5-1.2 Taxonomie:

Les entérobactéries appartiennent au règne des Bacteria, à l'embranchement des Protéobacteria, à la classe des Gamma-protéobacteria à l'ordre des *Enterobacteriales* et à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Actuellement plus de 40 genres et plus de 1700 espèces différents sont décrits au sein de cette famille. Leur classification est basée sur l'étude de leurs caractères phénotypiques (fermentation de différents sucres, production ou non de sulfures, présence ou absence de certains enzymes du métabolisme et ou génotypiques (ribotypage, hybridation ADN/ADN).

Les entérobactéries qui intéressent la bactériologie médicale peuvent être regroupées en 4 tribus: *Escherichia*, *Klebsiellae*, *Proteae* et *Yersinia* (Tableau N° 1) [Denis ,2007].

Tableau N°1: Principaux groupes d'entérobactéries isolés en pathologie humaine

		Genre	Espèces
GROUPE I	<i>EDWARDSIELLEAE</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>SALMONNELLEAE</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
GROUPE II	<i>ESCHERICHIEAE</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>LEVINEAE</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>KLEBSIELLEAE</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
GROUPE IV	<i>PROTEAE</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>YERSINIEAE</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia</i> <i>pseudotuberculosis</i>

5-1.3- Habitat:

Les entérobactéries sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et de tous les animaux à sang chaud [Freney & Croze ,2007].

Escherichia coli et l'appellation commune "colibacille" est l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie. On peut les retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez les animaux [Livrelli et al ., 2007].

Klebsiella pneumoniae ou Pneumo bacille Friedlander est une bactérie saprophyte et très répandue dans la nature. Elle peut cependant, se trouver à l'état commensal dans le tube digestif et les cavités naturelles en particulier les voies respiratoires de l'homme [Drancourt, 2007].

Chez l'homme, *Enterobacter cloacae* est isolé de fèces. Dans la nature, on le rencontre dans les eaux usées, le sol, les aliments et l'environnement hospitalier.

Serratia marcescens colonise le système respiratoire, digestif et urinaire des patients. Bien que les germes isolés en milieu hospitalier soient le plus souvent responsables d'une colonisation asymptomatique.

Proteus mirabilis, ce sont des saprophytes de l'intestin dans lequel on ne les trouve normalement qu'en petit nombre. Ces bactéries sont aussi des hôtes normaux des téguments, des voies respiratoires supérieures et des orifices naturels. Ils sont répandus dans la nature, dans le sol, les eaux, notamment les eaux d'égout. Ce sont des pathogènes occasionnels.

5-1.4-Caractères morphologiques:

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, sauf pour le genre *Klebsiella* qui sont toujours immobiles [Wang et al ., 2008].

Les entérobactéries forment des colonies rondes, lisses, à bord réguliers, elles peuvent être de plus grande taille (3 à 4 mm) en cas de bactéries capsulées telle que les colonies de *K. pneumoniae* [Bonnet, 2006]. Elles peuvent être capsulées, donnant des colonies muqueuses et bombées.

5-1.5-Caractères culturels:

Se développent bien sur un bouilliant ou sur une gélose après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C.

5-1.6Caractères biochimiques

L'étude des réactions biochimiques permet l'identification des différentes espèces d'entérobactéries (Tableau N°2).

E. coli est caractérisée par la production d'indole à partir du tryptophane et l'absence de culture sur milieu citrate de Simmons due à son inaptitude à utiliser le citrate comme seule source de carbone. Ces bactéries sont par ailleurs dépourvues d'uréase, ne produisent pas d'acétone, métabolite intermédiaire de l'acide pyruvique, mis en évidence par la réaction de Voges-Proskauer (VP) et sont donc VP négatives, ne produisent pas d'hydrogène sulfuré (H₂S), ne possèdent pas d'arginine dihydrolase (ADH) mais possèdent une lysine décarboxylase (LDC).

K. pneumoniae est uréase positive, VP positive, citrate positive. Elle est par contre H₂S négative, TDA (tryptophane désaminase) négative et indole négative.

Les principaux caractères biochimiques permettant l'identification d'*E. cloacae* sont uréase négatif, H₂S négatif par contre VP positif, citrate positif [Denis ,2007].

Revue bibliographique : Chapitre I

Tableau N°2 : Identification des genres d'entérobactéries selon la mobilité et les caractères biochimiques

	Mannitol-mobilité		Urée-indole			Kligler					M. citrate Simmons	Gélatinase
	Mannitol	Mobilité	Uréase	Indole	TDA	H ₂ S	Gaz en Glc	Lactose	ONPG	LDC		
<i>Salmonella I</i>	+	+	-	-	-	+ (-)	+	-	-	+	+ ou -	-
<i>Salmonella III</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+ (-)	-
<i>E.coli</i>	+	+ ou -	-	+	-	-	+	+	+	+ ou -	-	-
<i>Shigella</i>	+ (- Sh.A)	-	-	+ ou -	-	-	-	-	- ou +	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	-	-	-	+	- (+)	+	-	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	-	-	-	- (ou faible)	-	+	+	+	+
<i>Proteus</i>	-	++	++	+ ou -	+	+	+	-	-	-	- ou +	+
<i>Morganella morganii</i>	-	+	++	+	+	-	- (+)	-	-	-	-	-
<i>Providencia</i>	+ ou -	+	+ ou -	+	+	-	- (+)	-	-	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	- (37°C)	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-

ONPG : O-nitrophényl-β-D-galactopyranoside, LDC : lysine décarboxylase ; TDA : tryptophane désaminase; H₂S :Hydrogen sulfide.

5-1.7 Caractères antigéniques:

Au sein de chaque genre, on individualise des espèces, par l'étude des caractères biochimiques ou antigéniques. Les entérobactéries possèdent toutes des antigènes (Ag) de paroi (« somatiques ») ou antigènes O. Les entérobactéries mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelle (« flagellaires ») ou antigènes H. Enfin, certains possèdent un antigène d'enveloppe ou antigène K.

L'Ag O: L'antigène O est l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. Il est composé de lipopolysaccharides (LPS) complexes, très toxiques, capables de provoquer dans l'organisme humain fièvre, leucopénie, bradycardie, hypotension et choc, coagulation intra-vasculaire disséminée et mort. L'antigène O est constitué d'une mosaïque d'antigènes dont certains sont des constituants communs à toutes les entérobactéries et germes apparentés, et d'autres, des constituants spécifiques de chaque espèce.

L'Ag H: Ag flagellaire H n'est pas toxique, il n'est présent que chez les souches mobiles. Il est de nature protéique et est constitué d'une protéine, la flagelline. Il est constitué comme l'antigène O d'une mosaïque d'antigènes avec des constituants communs à toutes les entérobactéries mobiles et des constituants spécifiques à chaque espèce. *K. pneumoniae* est une bactérie immobile donc ne présente pas l'Ag H [Drancourt, 2007].

L'Ag K : Ag capsulaire ou Ag de surface généralement constitué d'une couche externe de polysaccharides [Liverlli et al., 2007].

L'Ag de Kunin : il est commun pour toutes les entérobactéries.

L'association des spécificités des Ag O, H et éventuellement K permet de caractériser une souche par exemple *E. coli* entéropathogène: 0111: H2 : K4 [Liverlli et al., 2007].

5-1.8-Pouvoir pathogène:

Les entérobactéries peuvent être responsables de divers types d'infections.

E. coli est le plus souvent responsable d'infections intestinales et extra intestinales telles que les septicémies et les infections urinaires. En effet, *E. coli* est responsable de 85 à 90% d'infections urinaires contractées en ville [Liverelli et al., 2007].

K. pneumoniae peut être responsable de plusieurs types d'infections en milieu hospitalier, notamment dans les services de réanimation médicale et chirurgicale. Il s'agit principalement de broncho-pneumopathies, de surinfections respiratoires, d'infections urinaires et de septicémies. Les infections communautaires à cette bactérie sont exceptionnellement rencontrées [Drancourt, 2007].

E. cloacae est un germe qui colonise souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par des antibiotiques, et peut être à l'origine d'infections urinaires et de pneumonies, ainsi que d'infections cutanées et de bactériémies. C'est un pathogène dont l'incidence en milieu hospitalier a considérablement augmenté ces dernières années [Davin-Régli & Bonnet, 2007].

5-2- Sensibilité aux antibiotiques:

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M, Macrolides, lincosamides, synergistines et glycopeptides. Elles sont habituellement sensibles aux β -Lactamines, Phénicoles, Tétracyclines, Sulfamides, Triméthoprime, Nitrofuranes, Fosfomysine, Colistine et Aminoglycosides (Kanamycine, Gentamicine, Tobramycine, Amikacine et Nétilmicine) [Bonnet, 2006].

5-2.1-Les bêta-lactamines (β -lactamines)

5-2.1.1-Structure et classification

C'est une grande famille d'antibiotique dont le représentant le plus ancien est la pénicilline G. Toutes les β -lactamines ont une structure commune, le noyau β -lactame (noyau azétidinone), dont l'intégralité est indispensable à leur activité.

La famille des β -lactamines comprend actuellement un nombre important de produits utilisés en thérapeutique, la plus part obtenue par héli-synthèse. On peut les classer selon la nature du noyau contenu dans leur structure de base (Figure N°3).

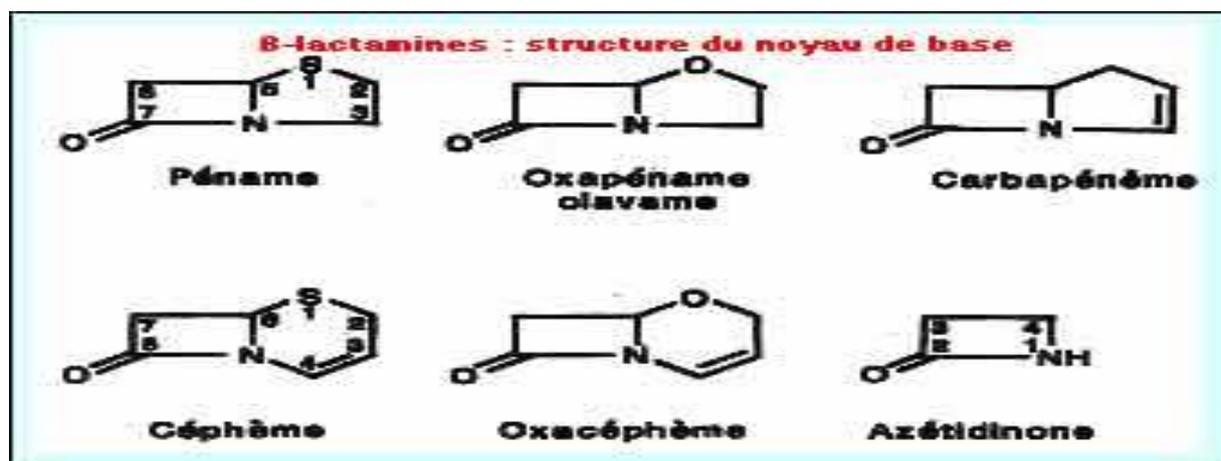


Figure N°3 : Représentation de principales classes de β -lactamines selon la nature du noyau contenu dans leur structure de base

A-Les pénames

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle thiazolidine, correspondant aux pénicillines. Les molécules se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone 6 et se répartissent en cinq sous-groupes :

- Le sous-groupe de la pénicilline G (benzylpénicilline) a pour spectre d'action les bactéries à Gram positif et les cocci à Gram négatif, à l'exception des souches productrices de pénicillinases. Il comprend la pénicilline G, ses formes retard et quelques pénicillines orales (pénicilline V, phénéticilline, propicilline, clométhocilline);
- les pénicillines anti-staphylococciques, résistantes à la pénicillinase du staphylocoque : méthicilline et isoxazolyl- pénicillines (l'oxacilline, la cloxacilline, la dicloxacilline);
- les pénicillines à large spectre, actives aussi sur certains bacilles à Gram négatif mais sensibles à l'action de la pénicillinase du staphylocoque ou des β -lactamases des Gram négatifs;
- les aminopénicillines (l'ampicilline, l'amoxicilline, l'épicilline);
- les carboxypénicillines (la carbénicilline et la ticarcilline) et l'apalcilline;
- les amidinopénicillines (l'amidinocilline ou la mecillinam et la pivmécillinam) ne sont actives que sur les bacilles à Gram négatif;

Revue bibliographique : Chapitre I

- les inhibiteurs de β -lactamases, produits dont le radical R6 est un halogène (I ou Br) ou pénicillines-sulfones notamment le sulbactam.
- Les Oxapénams ou clavams

Le représentant de ce groupe est l'acide clavulanique, d'activité antibactérienne très faible mais utilisé comme inhibiteur de β -lactamases en association avec l'amoxicilline ou la ticarcilline.

B-Les Carbapénems

La N-formidoyl-thiénamycine ou imipénème est le seul produit actuellement utilisé. Doué d'un large spectre d'action, il est remarquable par sa grande stabilité vis à vis de diverses β -lactamases.

C-Les Céphems

Ils correspondent aux céphalosporines au sens strict. Les produits utilisés sont des dérivés semi-synthétiques de la céphalosporine de 3ème génération elle-même produite par un champignon (Cephalosporium). Certains céphems sont produits par des bactéries (Streptomyces). Ce sont les céphamycines (la céfoxitine, le céfotétan)

- Les Oxacéphems

Un seul produit de synthèse totale a été développé : le latamoxef. Céphems, céphamycines et oxacéphems sont globalement désignés sous le terme de céphalosporines et classés, selon leurs propriétés antibactériennes, en quatre "générations".

Ce sont tous des produits à large spectre, mais dont l'intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif. De ce point de vue, les trois générations se distinguent par leur niveau d'activité intrinsèque et leur résistance à l'inactivation par les β -lactamases.

✓ **Les Céphalosporines de 1ère génération** : Elles peuvent être actives sur des souches résistantes aux pénicillines à large spectre. Elles sont par contre détruites par les céphalosporinases de nombreux bacilles à Gram négatif. Les principaux produits sont les suivants : la céfalotine, la céfacétrile, la céfapirine, la céfaloridine, la céfazoline inactives par voie buccale ; la céfradine, la céfalexine, le céfadroxil, le céfador, la céfatrizine, actifs par voie buccale.

Revue bibliographique : Chapitre I

- ✓ **Les Céphalosporines de 2ème génération** : Elles se distinguent des précédentes par une relative résistance à certaines céphalosporinases et un léger gain d'activité sur les souches sensibles. Ce sont les céfuroxime, céfamandole et céfoxitine.
- ✓ **Les Céphalosporines de 3ème génération** : Elles comprennent entre autres le céfotaxime, le latamoxef, la céftriaxone, la céftazidime, le céfménoxime et le céftizoxime. Quelques molécules proches des céphalosporines de 3ème génération, présentent des avantages particuliers relatifs à leurs propriétés antibactériennes ou pharmacologiques : céfopérazone, céfatiam, céfotétan, cefsulodine, céfixime.
- ✓ **Les Céphalosporines de 4ème génération** : Ce sont des 7-méthoxyimino céphalosporines zwitterioniques, caractérisées par la présence d'un ammonium quaternaire en position C3. Elles montrent peu d'affinité pour les β -lactamases de classe I et pénètrent très rapidement au travers de la membrane extérieure des bacilles à Gram-négatif. Elles comprennent au moins une demi-douzaine de produits incluant cefpirome, céfépime, cefclidine, céfozoprane.

D-Monobactames

Un produit est actuellement utilisé, l'aztréonam. Son spectre est limité aux bactéries à Gram négatif aérobies. Ces derniers sont en revanche, très actifs sur les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité antibactérienne à Gram négatif de l'Aztréonam, chef de file de cette classe, est globalement comparable à celle de céphalosporine de 3^{ème} génération comme la Céftazidime. L'Aztréonam présente une bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamines de spectre restreint. De plus, les monobactames constituent les seules β -lactamines non hydrolysées par la métallo- β -lactamines.

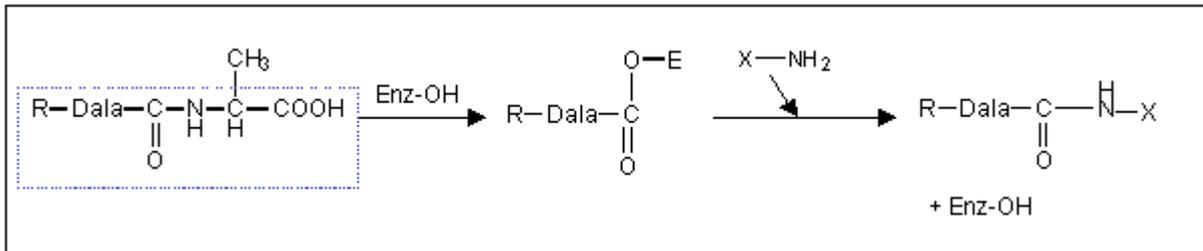
5-2.1 .2-Mécanisme d'action des β -lactamines

Les β -lactamines présentent une analogie de structure avec le peptide D-alanine-D-alanine du pentapeptide constitutif du peptidoglycane qui est le substrat naturel des protéines liant la pénicilline (PLP). Elles se comportent comme substrats suicides de ces enzymes. L'antibiotique se lie au site actif des PLP pour former un complexe pré-covalent, puis le cycle β -lactame des β -lactamines s'ouvre pour former une liaison covalente irréversible avec la serine active de la poche catalytique des PLP (Figure 4). L'effet d'une β -lactamines dépend de son affinité pour les différentes PLP.

L'inhibition des PLP induit un arrêt de la synthèse des peptidoglycanes et de la croissance bactérienne d'où l'effet bactériostatique des β -lactamines [Tankovic, 2000].

L'effet bactéricide des β -lactamines résulte de phénomène secondaire déclenché par l'inhibition des PLP. Il est initié par une altération du peptidoglycane qui induirait une activation dérégulée des autolysines pariétales (mureine hydrolase et endopeptidase) conduisant à la lyse bactérienne. Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamines doivent d'abord traverser la membrane externe par l'intermédiaire de porine, diffuser dans l'espace périplasmique et atteindre leur cible située sur la partie externe de la membrane cytoplasmique. Pour qu'une β -lactamine soit active, il faut que sa vitesse de pénétration soit supérieure à son taux d'hydrolyse par les β -lactamases.

1. Réaction de transpeptidation catalysée par la transpeptidase



2. Blocage de la réaction de transpeptidation par une beta-lactame

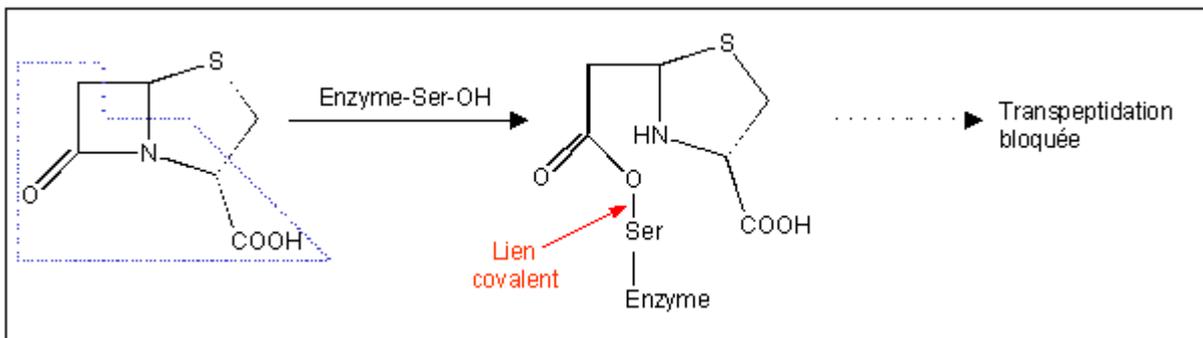


Figure N°4 : Mécanisme d'action des β-lactamines (<http://www.antiinfectieux.org>)

5-2.1.2 Mécanismes de résistance aux β-lactamines chez les entérobactéries

Les entérobactéries peuvent résister aux β-lactamines par 4 mécanismes distincts: l'imperméabilité, l'excrétion par des systèmes d'efflux, la modification des PLP et la production des β-lactamases. Cette résistance peut être naturelle ou acquise [Stock & Wiedmann, 2001].

5-2.1.2.1 Imperméabilité: Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux molécules hydrophobes et de masse moléculaire élevée (pénicillines G, V et M).

Des résistances acquises par diminution de la perméabilité de la paroi ont été rapportées chez *E. coli*, *Klebsella*, *Proteus* et *Enterobacter* suite à une altération quantitative ou qualitative des porines [Bonnet, 2006].

5-2.1.2.2 Excrétion par des systèmes d'efflux : Ce sont des pompes métaboliques assurant l'expulsion active des produits toxiques comme les antibiotiques, en utilisant une force proton-motrice. En cas d'hyper expression, ces systèmes entraînent une résistance généralement à bas niveau et croisée, à différentes familles d'antibiotiques. La résistance par efflux est souvent couplée à une diminution de la perméabilité. L'association de ces deux mécanismes peut entraîner une résistance à haut niveau et simultanée vis-à-vis d'antibiotiques structurellement non reliés, constituant ainsi de véritables multi résistances [Nikaido, 1994].

5-2.1.2.3 Modification des PLP : Les cibles des bêta-lactamines sont des protéines enzymatiques insérées dans la surface externe de la membrane cytoplasmique dénommée protéine liant la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane constituant principale de la paroi bactérienne [Nanninga, 1991]. Les PLP sont des cibles physiologiques des antibiotiques de la famille des β -lactamines. Ce mécanisme de résistance est très rare chez les entérobactéries. Exemple des souches de *P. mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mércillinam ont été observés suite à une perte d'affinité de la PLP2 et une diminution de la quantité de PLP1A [Hedge & Sparrt ., 1985].

5-2 .1.2 .4 Production de β -lactamases : C'est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries.

5-2 .1.2 .4 1- Définition et mode d'action des β -lactamases

Les bêta-lactamases sont des enzymes constitutionnelles ou acquises produites par les bactéries. Leur activité enzymatique repose sur un résidu sérine actif chez les enzymes les plus fréquentes ou sur un non métallique Zinc (Zn^2) .Dans les deux cas, l'inactivation des β -lactamines est due à l'ouverture du cycle de β -lactame au niveau de la liaison amide, selon une réaction d'hydrolyse suite à l'activation d'une molécule d'eau (Figure N° 5).

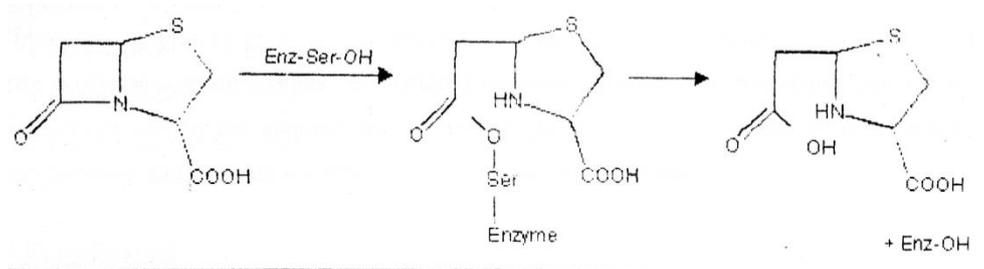


Figure N° 5. Mécanisme d'inactivation des β -lactamines (<http://www.antiinfectieux.org>).

5-2 .1.2 .4 1.2- Origine et évolution β -lactamases

L'analogie entre les structures tertiaires des PLP et des β -lactamases appuierait l'hypothèse que ces enzymes soient originaires des PLP [Kelly et al., 1986; Massova & Mobashery, 1998].

Les gènes qui codent pour ces β -lactamases peuvent être chromosomiques, faisant partie du patrimoine génétique de certaines espèces bactériennes ou portés par des éléments génétiques mobiles (des plasmides, des intégrons et des transposons). Au cours du temps, et vu l'utilisation massive des β -lactamines, en particulier celles à large spectre (C3G et imipénème), un nombre très important de nouvelles β -lactamases, ayant des spectres d'hydrolyse de plus en plus larges, sont apparues. Celles-ci furent baptisées « bêta-lactamases à spectre élargie » (BLSE) [Philippon et al., 1989]. Les événements génétiques incriminés dans cette évolution sont de 2 types: évolution d'enzymes anciennes par mutations ponctuelles ou multiples et surtout par acquisition de nouveaux gènes par des échanges entre les bactéries, actuellement, plus de 400 enzymes différentes ont été identifiées.

5-2.1 .2 .4 1.3- Classification

La diversité de ces enzymes a entraîné de nombreuses tentatives de classification, deux sont actuellement utilisées (Tableau N° 3).

5-2.1 .2 .4 1.3-1- La classification d'Ambler [Ambler, 1980].

Cette classification est basée sur la séquence primaire en acides aminés des éléments conservés du site actif. Ainsi, 4 classes A, B, C et D ont été identifiées (A, C, D = Enzymes à sérine active et B = Metallo-enzyme à zinc)

5-2.1 .2 .4 1.3-2- La classification de Bush, Jacoby et Medeiros [Bush et al., 1995].

Cette classification repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des β -lactamases aux inhibiteurs tels que l'acide clavulanique et l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Cette classification rend compte de la diversité fonctionnelle des β -lactamases au sein des 4 classes structurales, ainsi on distingue 3 groupes.

Revue bibliographique : Chapitre I

Tableau N°3 : Classification des β -lactamases d'après Ambler et Bush [Bonnet, 2006]

Classification			Activité enzymatique préférentielle							Activité inhibitrice	
Structurale d'Ambler	Fonctionnelle de Bush	Enzyme	PEN	Carboxyd	Oxa	CIG	C3G	ATM	IMP	Ac Clav	EDTA
Enzyme à sérine active											
A	2a	Pénicillinase à spectre restreint	+++	++	-	+/-	-	-	-	+++	-
	2b	Pénicillinase à large spectre	+++	++	+	++	-	-	-	+++	-
	2be	β -lactamases à spectre étendu	+++	++	+	++	++	++	-	+++	-
	2br	TEM résistantes aux inhibiteurs	+++	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	2c	Carbénicillinases	++	+++	+	+	-	-	-	+	-
	2 ^e	Céfuroximases	++	++	-	++	+	-	-	+++	-
	2f	Carbapénémases	++	+	+	+	+	++	++	+	-
C	1	Céphalosporinases	++	+	-	+++	+	-	-	-	-
D	2d	Oxacillinases	+	+++	V	V	-	-	V	-	-
Metallo-enzyme à Zinc											
B	3	Carbapénémases	++	++	++	++	++	++	++	-	++

L'efficacité enzymatique des β -lactamines et l'activité des molécules inhibitrices sont indiquées par des signes + et -

PEN : Pénicillines, CarboxyP : Carboxypénicillines, Oxa : Oxacilline, CIG : Céphalosporines 1^{ère} génération, C3G : Céphalosporines 3^{ème} génération

ATM : Aztréonam, IMP : Imipénème, Ac Clav : Acide clavulanique, V : variable, EDTA : acide éthylène diamine tétra- -acétique

5-2 .1.2 .4 1.4- β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Ces enzymes appartiennent au sous-groupe 2be de la classe A d'Ambler et ont une serine au niveau de leur site actif. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième et troisième génération ainsi que la céfépime et l'aztréonam mais non les céphamycines, ni les carbapénèmes. Les événements génétiques expliquant la diversité de ces enzymes sont de deux ordres.

Evolution d'enzymes «anciennes» telles que TEM-1, TEM-2 (TEMONEIRA le nom du patient) ou SHV-1 (SULFHYDRYL VARIABLE) par une ou plusieurs mutations définissant les BLSE dérivés de TEM et de SHV [Paterson & Bonomo, 2005].

On compte actuellement plus de 160 dérivés de TEM et plus de 110 dérivés de SHV. Une mise à jour régulière des nouvelles enzymes est disponible sur le site <http://wwwv.lahey.org/Studies/>, les BLSE de type TEM ont été fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae* mais aussi rapportées chez les autres membres de familles d'entérobactérie mais aussi chez *pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* [Sinha et al., 2007; Nasehi et al., 2010; Ben et al., 2011 ; Ramoul et al., 2013].

En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli*.

La majorité des dérivés de SHV-1 ont un phénotype de BLSE, identifiées partout dans le monde. SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe [Cantón & Coque, 2008] et SHV-11 identifiée en Korea [Lee et al., 2006], india [Ahamed et al.,1999], Maroc [Hays et al., 2012], cependant SHV-12 et SHV-11 ont été déjà détectées en Algérie [Messai et al., 2008 ; Meradi et al.,2011].

Avant 2002, les BLSE de types TEM et SHV étaient majoritaires. Elles étaient isolées en milieu hospitalier, essentiellement chez *K. pneumoniae*. L'apparition de «nouveaux» gènes transférables au sein d'éléments génétiques mobiles définissant les BLSE non dérivés de TEM et de SHV [Bradford, 2001].

Revue bibliographique : Chapitre I

Aujourd'hui CTX-M (CEFOTAXIMASE-MUNICH) est la BLSE la plus souvent isolée dans le monde. Les études de la phylogénie des CTX-M et la comparaison de leurs séquences en acides aminés ont montré qu'elles peuvent être réparties en 5 groupes avec une identité supérieure à 94% entre les membres d'un même groupe et une identité inférieure à 90% entre les membres de groupes distincts (Tableau N° 4).

Le groupe CTX-M-1 (CTX-M-1, CTX-M-3,-10,-11,-12,-15,-22,-23, 29, 30, 32, 33,28, 36, 54 et UOE-1)

Le groupe CTX-M-2 (CTX-M-2, -4, -6, -7, -20, 3, 44 ou Toho-1 et FEC-1)

Le groupe CTX-M-9 (CTX-M-9, -13, -14, -16, -17,-18, -19, -24, -27, -45 ou Toho-2,-46, -47, -48, -49, -50)

Le groupe CTX-M-8 (CTX-M-8, CTX-M-40)

Le dernier groupe CTX-M-25 (CTX-M-25, -26, -39 et -41),

La première CTX-M (FEC-1) a été découverte en 1986, au Japon, chez une souche d'*E. coli* isolée à partir de la flore fécale d'un chien de laboratoire [Ishii et al., 1995, Matsumoto et al., 1988]. En 1989, en Allemagne fut décrite la première souche humaine productrice de CTX-M (CTX-M-1) [Bauernfeind et al., 1990]. La même année, une enzyme identique appelée M'EN-1 a été décrite en France, chez un patient d'origine italienne [Bernard et al., 1992]. Depuis, les CTX-M ont rapidement diffusé à travers le monde (Tableau N°4). Actuellement, les souches productrices de CTX-M sévissent selon un mode endémique dans la plupart des pays européens, en Asie [Wang et al, 2003; Yamasaki et al., 2003], en Amérique du Sud [Bauernfeind et al., 1990; Radice et al., 2002] et au Canada [Boyd et al., 2004, Mulvey et al., 2004]. Par contre, elles restent sporadiques aux Etats-Unis [Moland et al, 2003].

Revue bibliographique : Chapitre I

Le typage moléculaire de ces enzymes a montré que certaines CTX-M sont spécifiques de certaines régions. Ainsi, CTX-M-9 et CTX-M-14 sont spécifiques de l'Espagne, CTX-M-1 de l'Italie, CTX-M-2 de la majorité des pays d'Amérique Latine, du Japon [Ben-Ami et al., 2006; Bonnet, 2006; Brigante et al., 2005]. Ces 2 dernières années, l'enzyme CTX-M-15 a été impliquée dans plusieurs épidémies hospitalières rapportées dans différents pays; Canada [Boyd et al., 2004], France [Eckert et al., 2004; Kassis-Chikhani et al, 2004; Lartigue et al., 2005; Lavollay et al., 2006; Neuwirth et al., 2003], Corée [Pai et al., 2001], Liban [Moubareck et al., 2005]. Sénégal [Weill et al., 2004] et dans les dix dernières années les pays du Maghreb; Tunisie [Bouallegue-Godet et al, 2005; Mamlouk et al, 2006]. Récemment le Maroc [Barguigua et al 2012].

En Algérie plusieurs études ont rapporté le groupe CTX-M-1 (CTX-M15 , CTX-M28 et CTX-M3) à l'est Algérien [Belbel et al., 2014, Nedjai et al ., 2012 ; Meradi et al., 2011 ; Touati et al., 2008], le centre de l'Algérie [Ramdani-Bougoussa et al., 2006; Messai et al., 2008 ; Labdene et al., 2008 ; Kermas et al .,2012] et l'ouest Algérien [Baba Ahmed-Kazi et al., 2013], ce dernier est le seul groupe identifié en Algérie, cependant CTX-M-15 a été mondialement distribué [Falagas & Karageorgopoulos, 2009]. Plusieurs facteurs ont pu concourir à ce Switch épidémiologique.

En effet, les mesures de lutte à fin d'endiguer l'épidémie de SARM, mises en place dans les années 1990, ont conduit à la diminution rapide du nombre de BLSE (TEM et SHV) dans le réservoir nosocomial [Ruppé, 2010]. Or les BLSE de type TEM ou SHV étaient essentiellement isolées chez *K. pneumoniae* et CTX-M-15 chez *E. coli* dont la propension à transmettre son matériel génétique est bien connue [Ruppé, 2010]. Alors que TEM et SHV restaient essentiellement cantonnées à l'hôpital, CTX-M diffusait beaucoup plus largement dans la communauté, notamment au cours d'infections urinaires et de bactériémies [Valverde et al., 2004] .

Par ailleurs, des clones d'*E. coli* producteurs de CTX-M-15 comme le sérotype O25b :H4, appartenant à la séquence type 131 sont responsables d'infections graves, ont désormais une diffusion mondiale [Rogers et al 2011].

Les autres types de BLSE: VEB (Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamse) PER (P*seudomonas* Ewtended Resistant) et GES (Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamse) sont rares chez les entérobactéries et principalement détectés chez les *P. aeruginosae* et

Revue bibliographique : Chapitre I

Acinetobacter spp [Naas et al., 2008], SME-1 et SME-2 (*Serratia Marcescens* Enzyme). Ces enzymes d'activité carbapenemase ont été identifiées chez *Serratia marcescens* [Queenan et al., 2000].

Tableau N°4 : Origine des différents groupes de CTX-M [Canton & Coque , 2006].

	Group CTX-M				
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
1 ^{er} enzyme décrite	CTX-M-1	FEC-1	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
Date d'isolement	1989	1986	1996	1994	2000
Pays	Allemagne	Japon	Brésil	Espagne	Canada
Progéniteur	k.ascorbata	k.ascorbata	K,georgiana	K,georgiana	NI

NI.non identifié

5-2.1 .2 .4 1.4- β -lactamases de type OXA (OXACILLINASE)

Elles appartiennent aux β -lactamases de la classe D et hydrolysent les isoxazolympénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline. Elles prédominent chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais sont détectées chez d'autres bactéries à Gram-négatif. Chez *E. coli* le type OXA-1 est le plus fréquent et souvent associé au *bla*_{CTX-M-15} chez les souches cliniques [Karisik et al., 2006 ; Abassi et al., 2008].

La majorité des β -lactamases de type OXA n'hydrolyse pas les céphalosporines à large spectre. Leurs actions sont différentes à celle des BLSE, mais actuellement il y' a 11 BLSE du groupe OXA dérivées de OXA-1, OXA-2 et OXA-10.

Les carbapénèmes sont souvent le traitement recommandé pour les infections graves provoquées par les entérobactéries productrices des β -lactamases à spectre étendu (ESBL). Cependant, la résistance aux carbapénèmes, résultant de la production de carbapenemase, réduit la possibilité de traitement des infections des souches multirésistantes.

Les entérobactéries produisant les carbapénemases ont été signalées de plus en plus dans le monde entier [Yong et al., 2009, Yan et al., 2001] et sont de plus en plus un problème de santé clinique et publique préoccupant [Potron et al., 2011a,b], cependant des oxacillines à activité carbapénemase de type OXA-48 ont été récemment détectées dans les souches d'*Enterobacter cloacae* au Maroc et en France [Poirel et al., 2011b; Potron et al., 2011b; Barguigua et al., 2012] et de type OXA-181 [Potron et al., 2011a].

5-2.1 .2 .4 1.5-Les Métallo-béta-lactamases

Ce sont des β -lactamases de classe B d'une activité carbapénémase ont été caractérisées chez les entérobactéries, ces enzymes hydrolyse toute les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Elles résistent aux β -lactamines inhibitrices mais sont sensibles à l'action inhibitrice de l'EDTA ce qui permet d'observer une image de synergie entre l'imipiném et l'EDTA.

Les Métallo-béta-lactamases (MBLs) ont été largement identifiées dans les entérobactéries spécialement en *K. pneumoniae* résistante à l'imipiném produisant la MBL IMP-1 (IMiPinem) en Japon [Shibata et al., 2003], Singapour [Koh et al., 1999], Brésil [Lincopan et al., 2005], Maroc [Barguigua et al., 2012] et IMP-8 a été détecté en Taiwan [Yan et al., 2001]. D'autres métallo-béta-lactamines tel que VIM-1 et VIM-4 (Verona integron-related metallo- β -lactamase) ont été rapportées en Grèce et Italie [Giakkoupi et al., 2003 ; Luzzaro et al., 2004].

NDM-1 est une métallo- β -lactamase (MBL) identifiée chez une souche de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes et dans les isolats d'*E. coli* provenant des patients transférés de Suède, en New Delhi et de l'Inde en 2008 [Yong et al., 2009]. Dans une courte période, les entérobactéries productrices de NDM-1 ont été rapportées en Afrique, en Asie, en Australie, au Canada, en Europe, au USA et au Royaume-Uni [Nordmann et al., 2011]. Le NDM-1 a été identifié récemment en Corée [Kim et al., 2012] et au Maroc [Barguigua et al., 2012].

5-2.2 -Résistance aux aminoglycosides

Ces antibiotiques sont des inhibiteurs bactéricides de la synthèse protéique. Ils se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et inhibent l'étape d'initiation donnant des protéines tronquées et aberrantes [Mingeot-Leclercq et al., 1999].

5-2.2.1-Mécanisme de résistance

Trois mécanismes de résistance ont été identifiés: l'altération de la cible ribosomale, la modification du transport et l'inactivation enzymatique des aminosides. C'est le dernier mécanisme qui est le plus fréquent et qui implique trois types d'enzymes: les aminoglycoside phosphotransférase (APH), les adényltransférases (ANT) et les acétyltransférases (AAC), dont les gènes sont localisés sur des plasmides, des transposons ou contenus dans des intégrons [Mingeot-Leclercq et al., 1999]. Les deux premières enzymes catalysent respectivement la phosphorylation et la nucléotidilation des groupements hydroxyles des aminoglycosides, ce qui empêche leur fixation sur le site A du ribosome. La troisième catalyse l'acétylation des groupements aminés.

5-2.3-Phénotypes de résistance naturelle chez les entérobactéries

Les entérobactéries peuvent être classées en 6 groupes phénotypiques de résistance, selon leur production naturelle de β -lactamases [Bonnet, 2006].

- **Groupe 0:** phénotype «sensible» d'espèces dépourvues de gènes de β -lactamases.
Salmonella spp et *Proteus mirabilis*.
- **Groupe 1:** phénotype «sensible» d'espèces produisant naturellement à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC *E. coli* et *Shigella* spp.
- **Groupe 2:** phénotype «pénicillinase à bas niveau»
Klebsiella spp, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermanni* produisent naturellement et de façon constitutive des enzymes chromosomiques de classe A, sensibles aux inhibiteurs (SHV-1 pour *K. pneumoniae*, OXY pour *k. oxytoca*)

- **Groupe 3:** phénotype «céphalosporinases de bas niveau»
Les entérobactéries appartenant à ce groupe rugissent des espèces productrices de céphalosporinases de classe C chromosomiques et inducibles par les β -lactamines.
- **Groupe 4:** *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola* produisent naturellement une céphalosporinase inducible de classe C et une enzyme de classe A.
- **Groupe 5:** phénotype «céfuroximase»
P. Vulgaris et *P. panneri* produisent naturellement une céphalosporinases de classe A, inducible par les β -lactamines souvent appelée céfuroximase (groupe fonctionnel 2e).
- **Groupe 6:** phénotype «BLSE»
Kluyvera ascorbata, *Kluyvera cryocrescent*, *Kluyvera geaogiana*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacler sedlakii* et *Erwinia persicina* produisent naturellement des BLSE de classe A (groupe 2be) qui sont souvent exprimées à bas niveau.

6-Chapitre II : Etude bactériologique des bacilles à Gram négatif non fermentaires responsables des infections respiratoires basses

6-1. Définition

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires, sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique, ne faisant pas intervenir la fermentation [Richard & Kerdjian, 1995].

6.2. Taxonomie

6.2.1. Habitat

Environ 15 % de tous les bacilles à Gram négatif se développant en aérobiose, isolés dans les laboratoires de bactériologie médicale, sont des non fermentaires.

Deux espèces : *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* représentent jusqu'à 75 % de ces isolements. Ces germes sont pour la plupart des pathogènes opportunistes

dont l'habitat naturel est le milieu extérieur [Gassama et al., 1999 ; Richard & Kerdjian, 1995].

6-2.2. Classification

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont à l'heure actuelle mieux classés grâce à de nombreuses études génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN.

6-3. Les caractères bactériologiques

6-3.1. Les caractères morphologiques

Les bacilles à Gram négatif se présentent sous forme de bacilles longs et fins à extrémité effilée (*Pseudomonas*) mais également sous forme de diplobacilles à extrémité arrondie avec des formes coccoïdes et longues (*Acinetobacter*). Ils sont immobiles (*Acinetobacter*) ou mobiles.

On note la présence d'une capsule appelée Slime qui joue le rôle de facteur de virulence.

6-3.2. Les caractères culturels

En général, les bacilles à Gram négatif non fermentaires croissent sur milieux simples comme la gélose Tryptone-Caseine Soja (TSA) et la gélose lactosée de Drigalski à 30°C et souvent à 37°C, *Acinetobacter baumannii* est la seule espèce qui peut se cultiver à 44°C. Certaines de ces bactéries élaborent des pigments :

- La pyocyanine, pigment bleu-vert, est pathognomonique de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Des pigments allant du jaune pâle au jaune orangé peuvent être produits par diverses espèces au sein des genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Xanthomonas*.

Acinetobacter : oxydase négatif, Catalase + les autres caractères biochimiques sont cités dans le tableau N° 5.

Pseudomonas aeruginosa : Oxydase positif. Les autres caractères biochimiques sont cités dans le tableau N° 6.

Tableau N°5 : Caractères biochimiques du genre *Acinetobacter*

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	VP	ESC
RESULTATS	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	+/-	+/-	-	-	(+)	-	-

Tableau N°6 : Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+/-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-

6-3.3. Type respiratoire

Ce sont des germes aérobies stricts ou exigeants en oxygène. Elles respirent en aérobiose par phosphorylation oxydative. Certaines espèces peuvent se multiplier au sein d'une gélose contenant des nitrates : c'est la dénitrification (Tableau N° 6).

Ces germes ne fermentent jamais le glucose mais peuvent l'attaquer par voie oxydative ou bien être inactifs vis-à-vis de ce sucre [Laffineur, 2002].

6-4. Etudes des principaux genres de bacilles à Gram négatif non fermentaire impliqués dans les infections respiratoires basses

6-4.1- Généralité

6-4.1.1 Le genre *Acinetobacter* :

Après 1986, la taxonomie du genre *Acinetobacter* a été considérée en combinant les hybridations ADN-ADN avec les caractères phénotypique .Les hybridations ADN-ADN ont permis d'individualiser 21 groupes d'hybridation à l'intérieur du genre. Les espèces génomiques 2, 4, 5,7et 12 ont respectivement été nommées *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* et *A. radioresistens*.

Longtemps considéré comme un représentant de la famille des Neisseriaceae, le genre *Acinetobacter* est actuellement inclus dans la famille des Moraxelleceae (ordre des pseudomonadales, classe des Gamma-protocobacteria, phylum des proteobacteria, domaine des bactéria). Ce sont des bactéries ubiquistes par excellence, mais on les rencontre également sur les revêtements cutanés de l'homme et des animaux [Peleg et al ., 2008].

L'espèce la plus souvent incriminée est *A. baumannii* qui a elle seule représente 90% des souches d'origine hospitalière [Schuetz et al., 2012], *A. baumannii* est responsable de 7.8% à 23% de mortalité causée par les pneumonies acquises à l'hôpital et 10% to 43% dans les unités des soins intensifs (USIs) [Kempf et al., 2012a; Falagas et al., 2006]. Ces dernières années, les *A. baumannii* ont été associés à des infections nosocomiales, en particulier chez les patients affaiblis. Les principaux sites d'infection sont les voies respiratoires, les voies urinaires, le sang, les plaies et les brûlures. Les patients souffrant de brûlures et ceux en unités de soins intensifs et / ou en utilisant de la ventilation mécanique sont plus à risque [Kempf et al, 2012a ; Kusradze et al, 2011].

6-4.1.2 Le genre *Pseudomonas*

Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, oxydase positive, non fermentaires, mobiles par une ciliature polaire (quelques exceptions), respirant ou non les nitrates, oxydant ou non le glucose, accumulant ou non du polybétahydroxybutyrate (PHB). Les espèces les plus fréquemment isolées en milieu médical sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*.

Pseudomonas aeruginosa Communément appelé bacille pyocyanique (mot grec: bacille agent du pus bleu), c'est la principale espèce du genre *Pseudomonas* de par sa fréquence et sa présence dans de nombreuses niches écologiques (eaux, végétaux, sols). C'est un petit bacille fin, à Gram négatif, mobile grâce à une ciliature de type polaire monotriche en « vol de moucheron », oxydase positive.

La culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose au sang TSA, MH est caractérisée par une odeur aromatique et la production de pigments (pyocyanine, pyoverdine). Sur le milieu Kligler-Hajna, on observe le brunissement de la pente et l'aspect métallisé de la culture.

Pseudomonas aeruginosa est le type même des bactéries opportunistes pathogènes chez l'immunodéprimé ou après un traumatisme grave ou chez les sujets brûlés.

Il est considéré comme l'agent principal de (45-70 %) des cas de pneumonie nosocomiale sous ventilation assistée [Chastre & Fagon, 2002].

Les souches plus particulièrement pathogènes sont productrices de : cytotoxine nécrosante ; exotoxine protéique.

6-4.2 Sensibilité aux antibiotiques

A. baumannii présente une remarquable capacité à développer rapidement une résistance aux antibiotiques qui a conduit à la multirésistance (MDR) dans quelques décennies [Kusradze et al., 2011]. À ce jour, certaines souches d'*A. baumannii* sont devenues résistantes à presque tous les agents antibactériens actuellement disponibles [Wang et al., 2007., Dijkshoorn et al., 1996] principalement grâce à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (plasmide, intégrons, élément transposable) portant des grappes de gènes codant pour la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques à la fois, ce qui rend plus complexe à la fois la

prévention et le traitement [Ben et al., 2011]. Cette longévité facilite la contribution de la propagation clonale des isolats, la transmission intra-humaine et la contamination de l'environnement [Higgins et al., 2010].

P. aeruginosa a toujours été considéré comme un agent pathogène difficile à traiter en raison de sa résistance aux antibiotiques, il n'est sensible naturellement qu'à un nombre restreint d'antibiotique.

6-4.2.1 Résistance enzymatique aux β -lactamines

A. baumannii est naturellement résistant à plusieurs β -lactamines du fait de l'association de différents mécanismes impliquant les β -lactamases, l'efflux ou l'imperméabilité. Ce micro-organisme produit naturellement deux type de β -lactamases une chéphalosporinase (β -lactamases de classe C d'Ambler) dénommé AmpC et une oxacillinase (β -lactamases de classe D) dénommé OXA-51.

Le mécanisme le plus répondu dans la résistance aux β -lactamines chez *A. baumannii* est la dégradation enzymatique par les β -lactamases [Zarrilli et al ., 2009].

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une β -lactamases chromosomique inductible de classe C. Cette enzyme n'est pas inhibée par la clavulanate. Cette résistance naturelle est due aussi à une mauvaise perméabilité membranaire. Il est donc naturellement résistant aux penicillines des groupes V, G, M, et A, à la plus part des céphalosporines de troisième génération et aux quinolones de première génération.

6-4.2.1.1 β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Contrairement aux entérobactéries la production des BLSE par les souches d'*Acinetobacter* et *Pseudomonas* restent restreinte à ce jour.

L'émergence des souches d'*A. baumannii* productrice de SHV-12 d'origine plasmidique (dérivée de SHV-1) a été rapportée par une étude chinoise [Huang et al ., 2004], des β -lactamases à spectre étendus TEM 1/2 [Ramoul et al ., 2013] et leur dérivées (TEM-92, TEM-116, TEM-4, TEM-21, TEM-42, SHV-2a, SHV-5 et SHV-12) ont été décrit chez *Acinetobacter*. Ces variants ont été identifiés de manière sporadique chez *P. aeruginosa*.

D'autres BLSE très répandues chez les entérobactéries ont été exprimées par les souches d'*A. baumannii* CTX-M-2, CTX-M-43 et PER-1 qui ont été détectées en France, Corée du Sud et Iran et VEB-1 au nord de la France, Belgique [Peleg et al., 2008] décrites essentiellement à partir d'isolat d'Asie du Sud Est dans les souches de *P. aeruginosa*.

OXA-58 est la seule oxacillinase de *P. aeruginosa* dont l'activité est bien inhibée par l'acide clavulanique et dont le phénotype de résistance induit est en tous point similaire à celui d'une β -lactamase à spectre étendu de classe A. La plus part des oxacillinases à spectre étendu chez *P. aeruginosa* sont des dérivées par substitutions ponctuelle des β -lactamases OXA-10 et OXA-2.

6-4.2.1.2 β -lactamases à spectre étendu à activité carbapénémase

Une augmentation de la prévalence des souches résistantes au carbapénèmes a été vue dans le monde entier et le traitement des souches multirésistantes peut être difficile [Drissi et al., 2010]. Les carbapénèmes ont été le médicament de choix contre cet agent pathogène, mais le nombre d'isolats résistants à ces agents antimicrobiens a augmenté considérablement [Ben et al., 2011].

A-Oxacillinase

Le mécanisme de résistance aux carbapénèmes par des oxacillinases à activité carbapénémase est émergent dans les isolats cliniques d'*A. baumannii*.

Les oxacillinases trouvés dans *A. baumannii* peuvent être sous-divisées en cinq groupes distincts: intrinsèque : OXA-51-like et acquise : OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like et OXA-143. La première identification d'enzyme de type OXA avec une activité d'hydrolyse pour les carbapénèmes, était d'une souche clinique d'*A. baumannii* isolée en 1985 d'Edimbourg, en Ecosse. Le plasmide codant pour cette résistance, a été d'abord nommé ARI-1, puis jugé transférable, et le gène a été séquencé et plus tard et nommé *bla*_{OXA-23} [Donal et al., 2000]. L'origine de *bla*_{OXA-23} a été récemment identifiée comme étant le chromosome d'*Acinetobacter radioresistens*, une espèce commensale de la peau humaine [Poirel et al., 2008a, b]. Ce type d'enzyme contribue désormais à la résistance des *A. baumannii* aux carbapénèmes dans le monde, provoquant des épidémies nosocomiales ou infections sporadiques [Ben et al, 2011; Kempf et al, 2012a].

Revue bibliographique : Chapitre II

Au meilleur de notre connaissance, la première souche clinique d'*A. baumannii* abritant le gène *bla*_{OXA-23} identifié en Algérie était en 2004 [Mugnier et al., 2010]. D'autres études ont été réalisées après quelques années rapportant la présence de ce gène parmi des souches cliniques d'*A. baumannii* [Ramoul et al., 2013 ; Touati et al., 2012, Bakour et al., 2012 ; 2013].

Les enzymes d'OXA-24-like ont été trouvées en Espagne, en Belgique, au Portugal, en République tchèque, en Géorgie, en France, aux Etats-Unis, et récemment dans l'est Algérien [Bakour et al., 2012] et les enzymes d'OXA-58-like ont été identifiés dans le monde [Kempf et al., 2012a], Y compris l'Algérie [Drissi et al., 2010, Touati et al., 2012], la Tunisie [Poirel et al., 2008b] et plus récemment en Turquie [Metan et al., 2013]. OXA-143 a été détectée chez les souches d'*A. baumannii* isolées des hôpitaux situés à São Paulo et Rio de Janeiro à ce jour, récemment un dérivé de ce gène appelé OXA-231 a été identifié dans un Centre Hospitalo-universitaire situé dans le sud du Brésil [Gionco et al., 2012].

Habituellement, les enzymes de type OXA ne présentent qu'une faible hydrolyse des carbapénèmes et n'indiquent pas toujours le profil de résistance, mais quand ils sont associés à des éléments d'insertion, ils peuvent avoir une augmentation de leur expression et de leur résistance aux carbapénèmes [He'ritier et al., 2006]. D'autres investigations sont nécessaires pour explorer l'environnement génétique des *bla*_{OXA} dans ces micro-organismes.

Chez *P. aeruginosa* les dérivées de BLSE OXA-10 et OXA-2 ont été identifiées, ces enzymes sont localisées sur des plasmides excepté (OXA-18), Ils hydrolysent la plus part des β -lactamines, y compris les céphalosporines, l'Imipénème et le Meropénème. L'Aztréonam et la Pipéracilline sont moins touchés, mais leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le Tazobactam [Pechère et al., 1998]. L'OXA-18 est la seule β -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique, cette dernière est localisée au niveau de chromosome chez *P. aeruginosa* [Naas et al., 1999]. En absence d'autre mécanisme de résistance (autre β -lactamine de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porine, ou pompes à efflux), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes [Walther-Rasmussen., al 2006].

B- métallo-béta-lactamines

Les metallo- β -lactamases (MBLs) ne sont pas souvent identifiées dans les souches d'*A. baumannii*, contrairement aux oxacillinases à activité carbapénémase, bien que les β -lactamases de classe A, C et D soient des effecteurs importants de la résistance aux β -lactamines.

Chez *P. aeruginosa* les enzymes de classe B (carbapénémase) ont une activité beaucoup plus forte d'hydrolyser les β -lactamines. Les MBLs sont capables d'hydrolyser les β -lactames (y compris les carbapénèmes) sauf les Monobactame et Aztréonam, quatre MBLs ont été identifié chez *A. baumannii* et *P. aeruginosa* : IMP, VIM, SIM et récemment NDM-1 et NDM-2 dans les souches cliniques d'*A. baumannii* [Pfeifer et al., 2011, Boulanger et al., 2012].

6-4.2.2 Résistance non enzymatique aux β -lactamines

Parmi les mécanismes de résistance non enzymatique aux β -lactamines chez les *A. baumannii* on trouve ; la pompe d'efflux, des modification de la perméabilité membranaire peuvent entrainer une résistance au carbapénèmes, ainsi la perte ou faible niveau d'expression de la protéine de la membrane externe CarO tel que 29 kDa (Caro), 33-39 kDa et 43 kDa (homologue à la protéine de résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* appelée OprD), et/ou une affinité altérée en protéines liant pénicilline (PLP) [Ben et al, 2011; Peleg et al., 2008].

Le principal mécanisme de résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes, est la réduction de perméabilité par perte de la porine OprD, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes, ou par surexpression de système d'efflux.

I- Le profil bactériologique et épidémiologique des infections respiratoires basses

1. Lieu et période d'étude

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire central de microbiologie, CHU Dr Dorban, Annaba.

La collecte des prélèvements positifs provenant du service de réanimation médicale de l'hôpital Ibn Sina, ce service accueille les patients âgés plus que 15 ans et le service de réanimation pédiatrique de l'hôpital Ibn Rochd qui accueille les patients âgés de moins de 15 ans.

L'étude s'est déroulée sur une période de deux ans entre Janvier 2010 et Octobre 2011.

2. Objectif

L'étude prospective descriptive que nous avons menée a pour objectif principale d'évaluer le niveau et le support génétique de la résistance aux antibiotiques responsables d'infections respiratoires basses.

Deux aspects nous ont intéressés pendant notre enquête :

- La résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux carbapenemes.
- La résistance aux antibiotiques des entérobactéries aux β -lactamines.
- l'étude de la diversité clonale des bactéries étudiées

3. Critères d'inclusion

Les souches bactériennes isolées de pneumonies nosocomiales (une validation clinique à été donnée pour les pneumopathies nosocomiales associées à la ventilation mécanique).

4. Critères de non inclusion

- La contamination du prélèvement
- Les doublants

5. Source de données

Les données sont collectés à partir de la fiche de renseignement accompagnant le prélèvement bactériologique reçus au laboratoire de microbiologie, et le registre des prélèvements du service de microbiologie et le logiciel WHONET 5,5 pour les antibiogrammes (logiciel utilisé pour la saisie des résultats au laboratoire de microbiologie).

II-Etude bactériologique

1-Souches bactériennes

95 souches bactériennes soit : 42 souches d'entérobactéries, 23 souches *Acinetobacter baumannii*, 22 souche de *Pseudomonas aeruginosa*, 8 souches de *Staphylococcus aureus* non répétitives isolées du prélèvement bronchique (prélèvement protégé distale).

2-Techniques bactériologique

2.1-Etude phénotypique

- Identification bactérienne
 - ✓ L'indentification des bactéries a été réalisée par : galerie biochimique API et MALDI-TOF
 - ✓ Test supplémentaire : de l'indentification d'*A. baumannii* incubation à 44°C
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques
 - ✓ Antibiogramme par diffusion de disque sur milieu gélosé selon le comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie [CA-SFM]
 - ✓ Détermination des concentrations minimales inhibitrices par méthode de dilution en milieu gélosé
 - ✓ Détermination des concentrations minimales inhibitrices par E-test
 - ✓ Test complémentaire :
 - dépistage des souches productrices de BLSE par le test de double disque.
 - Test de diffusion du disque de cefoxitine (30µg) et test de screening à l'oxacilline pour *Staphylococcus aureus*

2.3-Etude moléculaire

- ✓ Recherche par PCR standard les gènes de résistance aux β -lactamines : *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} et *bla*_{PER}.
- ✓ Recherche par PCR standard et en temps réel les gènes codants pour la résistance au carbapénèmes : *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24} et *bla*_{NDM-1}.
- ✓ Etude de la diversité clonale entre les souches par pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

3- Protocoles bactériologiques

Les examens bactériologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire central de microbiologie, CHU Dr Dorban, Annaba-Algérie.

L'étude de la biologie moléculaire a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de microbiologie, Hôpital Charles Nicolle, Boulevard April 9, 1006 Tunis, Tunisie et 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.

3.1-Etude phénotypique:

3.1.1-Isolement

Après l'homogénéisation du prélèvement bronchique (PPD) (Figure N°6), le cathéter est ensemencé directement avec une anse calibrée de 10 μ L sur les milieux de culture :

- ✓ Mac Conkey
- ✓ Gélose au sang cuit
- ✓ Milieu Chapman



Figure N° 6 : Cathéter de prélèvement protégé distal dans un tube à essais

3.1.2- Identification bactérienne

L'identification des Bacilles à Gram négatif collectées a été réalisée par deux méthodes :

3.1.2.1-API système

- **Entérobactéries par API 20 E :**

L'API 20 E (BioMérieux, Meylan, France) a été utilisée. Il s'agit d'un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe au d'espèce pour la plupart des entérobactéries rencontrées en bactériologie médicale.

Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37°C), se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- **Bacilles à Gram négatif non fermentaire par API 20 NE :**

Système API-20NE (BioMérieux, Meylan, France) : est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentant. 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 à fin de les identifier.

- **Coccis à Gram positif par API staph**

La galerie API staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans le médium d'Api staph. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37°C), se traduisent par des virages colorés spontanés ou par l'addition de réactifs.

- **Recherche de la culture à différentes températures (*Acinetobacter baumannii*)**

Parmi les tests d'identification, figure également la recherche de la croissance à 44°C, caractéristique de l'espèce *A. baumannii*, et à 41°C pour *A. junii*. Le test consiste à mettre quelques colonies d'une culture pure dans du bouillon glycosé tomponné ou du bouillon nutritif, les laisser 24h dans le bain marie à 44°C et à 41°C.

Matériel et méthodes

Un résultat positif se traduit par un aspect trouble du bouillon. Dans le cas d'un résultat négatif, le bouillon est ré-incube jusqu'à 48 h.

Avant leur utilisation, les milieux de culture liquides sont mis au bain marie une quinzaine de minutes pour avoir une température de 44°C et 41°C.

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

Cette technique est réalisée au niveau de 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. Cette technique a été appliquée seulement sur les bacilles à Gram négatif.

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) [Seng et al., 2010].

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 (Figure N° 7) [Seng et al., 2010].

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 TriFluoroacétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC (High-performance liquid chromatography) 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.

Matériel et méthodes

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 trifluoroacétique)
- 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 d'eppendorf propre. Ainsi la matrice prête à être utilisée.

- **Préparation des échantillons pour 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.

- **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 donnée étendue ouverte (tableau N° 7), pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par le MALDI-TOF est ≥ 1.9 [Seng et al., 2010].

Tableau N°7 : Interprétation des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	Green
1.900 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	Green
1.700 ... 1.899	probable genus identification	(+)	Yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	Red

Matériel et méthodes

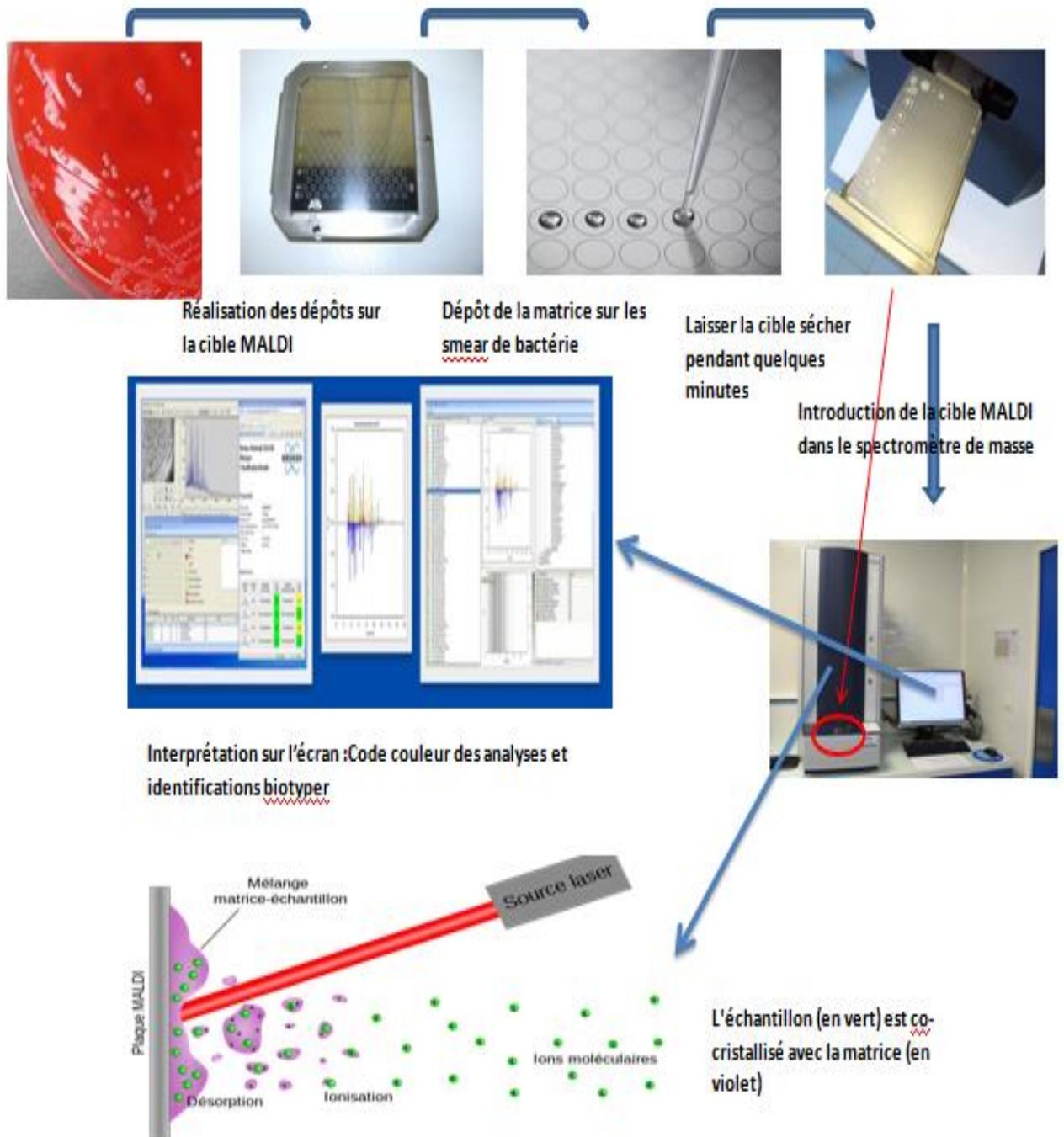


Figure N°7 : Identification des souches bactériennes par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Matériel et méthodes

3.1.3- Etude de la sensibilité aux antibiotiques

3.1.3.1- Antibiogramme par diffusion des disques 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 d'antibiotique, sur un milieu gélosé. Les antibiogrammes des souches 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 étéensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension bactérienne à 0.5 Mac Farland (une densité optique égale 0.2 à 650 nm) 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 (tableau N°8, 9, 10):

Tableau N°8 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries

Famille d'antibiotique	Charge de disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		résistant	intermédiaire	sensible	résistant	sensible
<u>β-lactamines</u>						
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	≤ 8
Amoxicilline+Ac. clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	≤ 8/4
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefotaxime	30µg	≤ 14	15 – 22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
Ceftazidime						
Ceftriaxone	30µg	≤ 13	14 – 20	≥ 21	≥ 64	≤ 8
Imipeneme	10µg	≤ 13	14 – 15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
<u>Aminosides</u>						
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Gentamicine	10µg	≤ 12	13– 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
<u>Quinolones</u>						
Acide nalidixique	5µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 8	≤ 2
Ciprofloxacine	5µg	≥ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
<u>Autres</u>						
Chloramphenicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	≤ 64
Trimethoprime/Sulfamethoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38

Matériel et méthodes

Tableau N°9: Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp.*

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<u>β-lactamines :</u>						
Ticarcilline :	75 µg					
- <i>P. aeruginosa</i>		≤ 14	---	≥ 15	≥ 128	≤ 64
- <i>Acinetobacter sp.</i>		≤ 14	15 - 19	≥ 20	≥ 128	≤ 16
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg					
- <i>P. aeruginosa</i>		≤ 14	---	≥ 15	≥ 128/2	≤ 64/2
- <i>Acinetobacter sp.</i>		≤ 14	15 - 19	≥ 20	≥ 128/2	≤ 16/2
Piperacilline :	100 µg					
- <i>P. aeruginosa</i>		≤ 17	---	≥ 18	≥ 128	≤ 64
- <i>Acinetobacter</i>		≤ 17	18 – 20	≥ 21	≥ 128	≤ 16
		≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Ceftazidime	30 µg	≤ 15	16 – 21	≥ 22	≥ 32	≤ 8
Aztreonam	10 µg	≤ 13	14 – 15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Imipeneme	10 µg					
<u>Aminosides</u>						
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Tobramycine	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
<u>Quinolones</u>						
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
<u>Autres</u>						
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38
Chloramphenicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
*						

Matériel et méthodes

Tableau N° 10 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus sp.*

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<u>βlactamines</u>						
: Penicilline	10 µg	≤ 28	---	≥29	-	≤ 0,1
Oxacilline**	1 µg					
<i>S. aureus</i>		≤ 10	11 – 12	≥13	≥4	≤ 2
Staphylocoque à coagulase négative		≤ 17	---	≥18	≥0,5	≤0,25
Cefoxitine	30µg					
<i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i>		≤ 19	---	≥20	≥4	≤ 2
Staphylocoque à coagulase négative		≤ 24	---	≥25	≥0,5	≤0,25
<u>Aminosides :</u>						
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 8	≤4
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 – 16	≥17	≥32	≤16
<u>Macrolides :</u>						
Erythromycine	15µg	≤ 13	14 – 22	≥23	≥ 8	≤0.5
Clindamycine	2µg	≤ 14	15 – 20	≥21	≥4	≤ 0,5
<u>Glycopeptides :</u>						
Vancomycine	30 µg	---	---	≥15	---	≤4
Teicoplanine	30 µg	≤ 10	11 – 13	≥14	≥32	≤8
<u>Quinolones</u>						
Ofloxacine	5µg	≤ 14	15 – 17	≥18	≥4	≤1
<u>Autres :</u>						
Trimethoprime/sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≤ 10	11 – 15	≥16	≥ 8/152	≤2/38
Rifampicine	15µg	≤ 16	17 – 19	≥20	≥ 4	≤1
Tetracycline	30µg	≤ 14	15 – 18	≥19	≥16	≤ 4
Chloramphenicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥18	≥32	≤ 8
Fosfomycine***	50µg	< 14	----	>14	≥ 32	≤ 32

Matériel et méthodes

Après une période d'incubation de 18 à 24 heures à 37°C. A l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés 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].

Le dépistage systématique des souches productrices de BLSE a été assuré par le test de double disque qui repose sur la mise en évidence d'une synergie entre des disques de Cefotaxime, Ceftazidime, Cefepime ou d'Aztreonam d'une part et un disque contenant un inhibiteur de β -lactamases tel que l'acide clavulanique, (Amoxicilline-Acide Clavulanique, Ticarcilline-Acide Clavulanique) ou le Tazobactam (Piperacilline-Tazobactam) d'autre part. Avec un espace de 3 cm entre le centre des disques. En cas de faux négatifs, la distance est réduite à 2 cm pour améliorer la détection de l'image en bouchon de champagne [Bonnet, 2006].

➤ **Recherche de la résistance de *Staphylococcus sp.* à l'oxacilline :**
a- Test de diffusion du disque de cefoxitine (30 μ g)

Technique :

La résistance des staphylocoques aux isoxazolyl pénicillines (oxacilline) est recherchée à l'aide d'un disque de cefoxitine (30 μ g) dans les conditions standards.

Lecture :

La lecture du diamètre d'inhibition doit se faire à l'aide d'un pied à coulisse.

- Pour *Staphylococcus* à coagulase négative :
 - Si le diamètre de la cefoxitine est ≤ 24 mm, **la souche est dite résistante à l'oxacilline.**
- Pour *Staphylococcus aureus* :
 - Si le diamètre de la cefoxitine est ≤ 19 mm, **la souche est dite résistante à l'oxacilline.**
 - Si le diamètre de la cefoxitine est ≤ 20 mm, **la souche est dite sensible à l'oxacilline.**

Devant tout problème d'interprétation, faire un test de confirmation par la technique du screening à l'oxacilline (Test SARM).

Matériel et méthodes

➤ Test de screening à l'oxacilline pour *Staphylococcus aureus* :

Devant tout problème d'interprétation du diamètre d'inhibition de la cefoxitine faire un screening test. Ce test concerne uniquement *Staphylococcus aureus*.

Milieu :

- Gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl, (milieu disponible à l'IPA) et de 6 µg/ml d'oxacilline.
- La préparation de la solution d'oxacilline se fait de la manière suivante :
Diluer 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au dixième. Répartir la solution obtenue à raison de 2ml par tube ; ainsi conditionnées ces solutions peuvent être conservées à -20°C pendant une semaine, au bout de laquelle elles doivent être renouvelées.
- Mettre 2ml de cette solution dans une boîte de 90mm de diamètre, ajouter 18ml de gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl. Mélanger en faisant des mouvements rotatoires.

Inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

Ensemencement :

- L'ensemencement se fait par spot, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne (ou ensemen-

Matériel et méthodes

un cadran en entier).

- Les souches de référence doivent être testées dans les mêmes conditions.

S. aureus ATCC 29213 souche sensible à l'oxacilline.

S. aureus ATCC 43300 souche résistante à l'oxacilline.

Incubation :

- 24 H à 35°C en atmosphère normale.

Lecture :

- La culture de plus d'une colonie de la souche test, suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les β -lactamines.

3.1.3.2- Détermination des concentrations minimales inhibitrices par méthode de dilution en milieu gélosé

La détermination des CMI des antibiotiques pour chaque espèce (Tableau N° 8, 9, 10), a été réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé MH, l'acide clavulanique a été à chaque fois utilisé à une concentration fixe de 2 μ g/l.

Les concentrations d'antibiotiques utilisées étaient de 2048 à 0,125 μ g/ml pour la Ticarcilline, de 128 à 0,007 μ g/ml pour le Cefotaxime, la Ceftazidime et la Cefoxitine, de 64 à 0,007 μ g/ml pour la Cefepirne, de 2048 à 0,03 pour Méropénème, Imipénème et l'Aztréonam. Un ml de chaque dilution de la gamme d'antibiotiques a été mis dans une boîte de Pétri stérile en allant de la concentration la plus faible à la plus forte. 18 ou 19 ml de gélose sont ajoutés à chaque boîte selon l'antibiotique qu'il soit associé ou non à l'acide Clavulanique en prenant soin de bien mélanger. Puis laisser la gélose se solidifier.

A partir d'une culture sur gélose nutritive de 18 à 24 h, un inoculum de 0.5 Mc Farland a été préparé pour chacune des souches à étudier. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'un inoculateur multipoint (Appareil de Steers) (Figure N°8) délivrant un inoculum d'environ 10⁴ UFC par dépôt.

La lecture des CMI a été réalisée après incubation de 18 h à 24h, chaque CMI est déterminée comme étant la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible du germe. Les tests de contrôle de qualité en cours ont été réalisés à l'aide des souches de référence suivantes: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25923.

Matériel et méthodes

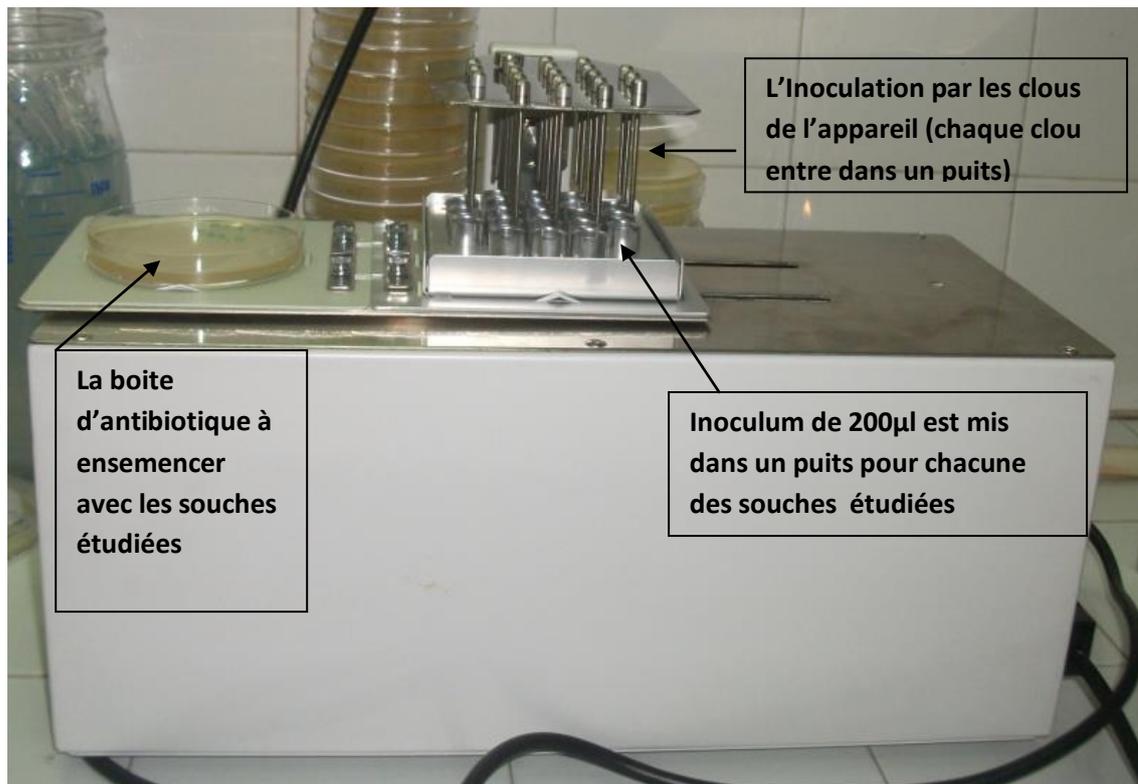


Figure N°8 : Inoculateur multipoint de type appareil de Steers automatique

3.1.3.3. 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 préétabli 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 E-test 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 fait 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 $\mu\text{g/ml}$.

3.2- Etude moléculaire

3.2.1-Recherche des gènes codant pour les β -lactamases de classe A d'Ambler

Au cours de notre travail, on a recherché par PCR standard des gènes de résistance aux β -lactamines de classe A d'Ambler chez les entérobactéries et *A. baumannii*. Les amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de différents gènes sont présentées dans le tableau N°11. Cette partie a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie, Hôpital Charles Nicolle, Boulevard April 9 ,1006 Tunis, Tunisie.

3.2.1.1-Polymerase chain reaction (PCR) standard

Le principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR), consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible (Figure N°9). Les réactions d'amplification des gènes codant pour les β -lactamases sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques (Tableau N°11), dans un thermocycleur de type BioRad.

✓ Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait en utilisant le Kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN [Courtabeuf, France] en suivant les recommandations du fabricant. Ainsi, 1,5 ml d'un bouillon des cultures de 18 h des souches à étudier ont été centrifugés pendant 10 min à 7500 tours/min, à température ambiante. Le culot a été ensuite repris dans 180 μ l du 1^{er} tampon de lyse (ATL), additionné de 20 μ l de protéinase K. Après incubation de 1h à 56°C, 200 μ l de 2^{eme} tampon de lyse (AL) ont été ajoutés à la suspension permettant ainsi la précipitation des protéines. Cette étape a été suivie d'une incubation de 1 min à 70°C. Après avoir ajouté 200 μ L d'éthanol pur, le mélange a été introduit dans une colonne QIAGEN. Les actions successives de 2 tampons de lavage (500 μ L de AW I et 500 μ l de A W2), chacune suivie d'une centrifugation de 3 min à 14000 tours/min ont permis l'élimination des résidus pour améliorer la qualité finale de l'ADN.

L'ADN a finalement été recueilli en ajoutant 200 μ l d'eau distillée stérile et en centrifugeant pendant 1 min à 8000 tours/min. Cette dernière étape a été renouvelée 2 fois. L'ADN génomique ainsi obtenu a été conservé à - 20°C.

Le milieu réactionnel, commun pour toute les PCR effectuées, comprenait dans un volume final de 50 μ l: 10 nmol de dNTP ; 1,25 U de Taq polymérase; 5 μ l de tampon 10 X, de la Taq polymérase (500 mM KCl; 15 mM MgCl₂ et 100 mM Tris-HCl): 25 pmol de chaque amorce et 1 μ l d'ADN génomique. Les dNTP, la Taq polymérase et son tampon provenaient de la société Amersham [Amersham Biosciences, Saclay, France].

Pour toutes les PCR, les conditions d'amplification étaient les suivantes : 5 min de dénaturation à 94°C, 35 cycles d'amplification (30s de dénaturation à 94°C, 30s d'hybridation à 55°C, 40s d'élongation à 72°C) et une élongation finale de 7 min à 72°C.

Tableau N° 11: Caractéristiques des amorces utilisées pour la recherche par PCR des gènes de résistance aux β -lactamines

Amorce	Nom d'amorce	Séquence d'amorce	Taille (pb)	Référence
<i>bla_{SHV}</i>	OS5	TCT CCC TGT TAG CCA CC	800	[Ruppé et al ., 2009]
	OS6	GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG		
<i>bla_{CTX-M}</i>	MA-1	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA	864	[Poirel et al ., 2008a ,2008b]
	MA-2	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG		
<i>bla_{PER}</i>	PER UP	ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC	927	[Nasehi et al .,2010]
	PER LOW	AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA		
<i>bla_{TEM}</i>	OT3	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	850	[Ktari et al ., 2006]
	OT4	CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG		

pb : paire de base

3.2.1.2- Electrophorèse sur gel d'agarose

La qualité de l'extraction de l'ADN a été évaluée par électrophorèse d'un échantillon de 5 μ l pendant 20 min à voltage de 100 V contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) dans un gel d'agarose à 1,5% .

✓ 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'a l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.
- Ajouter la Solution de bromure d'éthidium (BET) (3 fois 31.5 μ l pour 50ml) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.
- Laisser refroidir jusqu'a solidification de gel.

Matériel et méthodes

✓ **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve électrophorèse avec le tampon TB 0.5X (le gel doit être totalement émergé).

Déposer 4 μ l du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco- BRL, 15 628-019)] dans le premier puits. Mélanger 4 μ l 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 100V et régler la durée de migration (environ 20 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.

La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de poids moléculaire (1000 paires de base) en utilisant les témoins.

Matériel et méthodes

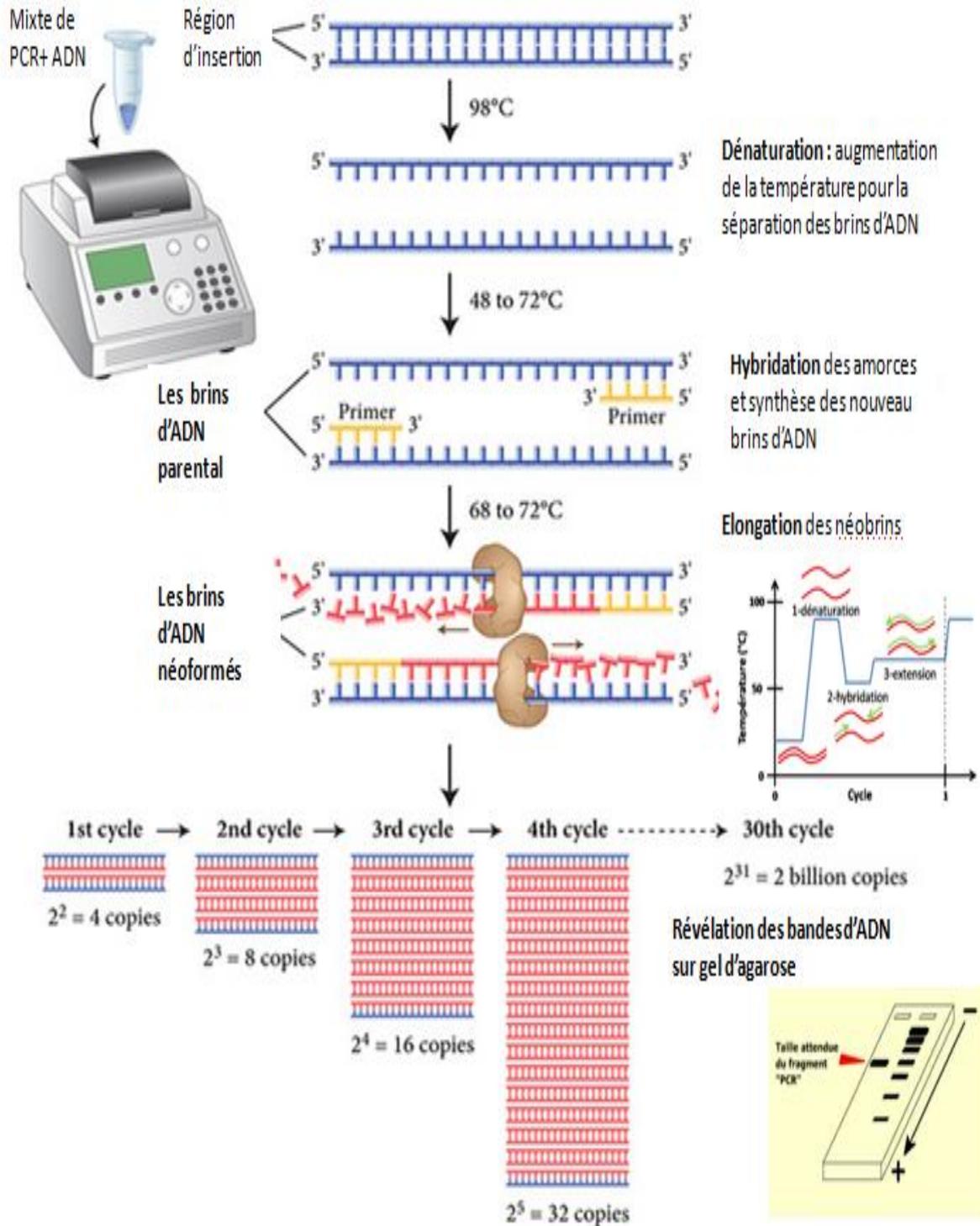


Figure N° 9 : Principe de la Polymerase chain reaction (PCR) standard

3.2.1.3- Séquençage

Le séquençage des gènes codant pour des β -lactamases a été réalisé selon la méthode d'incorporation didésoxynucléotides (ddNTP) terminateur de chaîne, de Sanger [Sanger et al., 1977]. Après purification et quantification, un échantillon de 10 μ l du produit de PCR a été utilisé comme une matrice d'une réaction d'amplification enzymatique en présence de ddNTP marqués au Big-Dye.

✓ Purification

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

On ajoute au produit PCR 100 μ l 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 μ l d'eau ultra pure et agite pendant 20 min sur un agitateur.

✓ PCR Big-dye

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. La réaction se déroule dans un volume final de 20 μ l, contenant 4 μ l du mélange Big-Dye : Ampli TaqDNA Polymerase FS, 4 μ l du tampon de réaction 2,5X (5X 400 mM Tris- HCl, pH 9; 10 mM $MgCl_2$), 2 μ l des amorces qui ont servi pour l'amplification de ces gènes de 10 μ l d'ADN. Les produits de marquage par le Big-Dye ont ensuite été précipités avec de l'isopropanol 75%, séchés et repris dans 18 μ l du tampon TSR (Template Suppression Reagent). Après dénaturation, les fragments d'ADN ont été résolus par électrophorèse automatique (ABI Prism™ 310) et le programme «séquence Analysis» [Perkin Elmer Applied Biosystems].

✓ Analyse des séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques récupérées ont ensuite été converties en format Fasta et alignées avec les séquences disponibles dans les banques de données en utilisant le logiciel BIOEDIT.

3.2.2. Recherche des genes codants pour les carbapénemase par PCR

3.2.2.1-Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

La PCR, en temps réel, est une technique qui repose d'une part sur l'amplification des acides desoxyribonucleiques (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.

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.

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'-exonucléase, 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.

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

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.

Matériel et méthodes

Le protocole utilisé dans ce travail est le suivant: dans une plaque pour Thermocycleur Stratageme **MX 3000P**, on dépose 20 µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 12 ci-dessous) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

Le dépistage des gènes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{NDM-1}, a été réalisé sur les souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipenem en utilisant des amorces et des sondes spécifiques (tableau N° 13).

Tableau N°12 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR en temps réel

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

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-58}) [Kusradez et al ., 2011].
- *Klebsiella pneumoniae* [Kpnasey (*bla*_{NDM-1})] [Diene et al ., 2011]

Matériel et méthodes

Tableau N° 13 : Amorces utilisées pour les PCR en temps réel

Gène	Amorce	Séquences des amorces	Taille	Référence
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA23-F	TGCTCTAAGCCGCGCAAATA	130pb	[[Kusradez et al., 2011]
	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> _{NDM-1}	NDMI-F	GCGCAACACAGCCTGACTTT	155pb	[Diene et al., 2011]
	NDMI-R	CAGCCACCAAAGCGATGTC		
	NDMI-probe	FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA		

Pb : paire de base; F: Forward; R: Reverse

3.2.2.2-Polymerase chain reaction (PCR) standard

Les réactions d'amplification des gènes codant pour les carbapénémase sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques (tableau N° 15), dans un thermocycleur de type BioRad.

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 14 ci-dessous) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

Matériel et méthodes

Tableau N° 14 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard

Mix RT-PCR pour une réaction	Quantité PCR en temps réel
Quantité ct Probe PCR Master Mix	12.5µl
Amorce Forward	0.5µl
Amorce Reverse	0.5µl
H ₂ O UP	6.5µl
ADN à amplifier	5µl
Volume total	25µl

Tableau N° 15: Séquences d'amorce utilisées dans PCR standard dans cette étude

Amorce	Nom d'amorce	Séquence d'amorce	Taille (pb)	Référence
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA24-F	ATGAAAAAATTTATACTTCTATATTCAGC	825	[Sinha et al ., 2007]
	OXA24-R	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC		
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA58-F	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	595	[Sinha et al ., 2007]
	OXA58-R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG		
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	
	OXA23-R	ATTCTGACCGCATTTCAT		[Feizabadi et al ., 2008]
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	
	OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		[Feizabadi et al ., 2008]
NDM-1	NDM-1-F	CATTGCGGGGTTTTAATG	998	[Diene et al ., 2011]
	NDM-1-R	CTGGGTCGAGGTCAGGATAG		

Matériel et méthodes

3.2.2.3 Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée, en utilisant le kit Big-Dye 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.

✓ PCR Big-Dye

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR BigDye est le suivant: dans une plaque de thermocycleur Bio-rad on dépose 20µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 16) dans chaque puits

Tableau N°16 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big-Dye

Composant pour Forward	Composant pour Reverse	Quantité PCR BigDye
Buffer	Buffer	3µl
Mix BigDye	Mix BigDye	2µl
Amorce F	Amorce R	1µl
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4µl
H ₂ O UP	H ₂ O UP	10µl
Volume Total	Volume Total	20µl

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 17.

Tableau N°17: 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	∞

Sec : seconde, min : minute.

Matériel et méthodes

✓ Purification par Séphadex

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 10 min 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 10 min 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,

✓ 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/>), comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale «GenBank ». Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches.

3.2.3 -Etude de la diversité clonale par Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Le typage moléculaire de toutes les souches étudiées a été confirmé par PFGE [Smith & Cantor, 1987].

✓ Préparation des ADN

1- Centrifuger 2 fois de suite, 1 ml d'un bouillon de culture de gélose nutritive de 18H de la souche à étudier.

Matériel et méthodes

- 2- Suspendre le culot obtenu dans 120 μ l de tampon PIV.
- 3- Préparer la solution de Low Melt Agarose (Bio-Rad) à 1.6% en eau distillée, maintenue en surfusion à 60°C au bain marie.
- 4- Ajouter 120 μ l de cette solution de Low Melt Agarose à la suspension bactérienne.
- 5- Couler le mélange dans des moules et laisser se solidifier à 4°C pendant une vingtaine de minutes.
- 6- Transférer chaque bloc dans un tube d'ependorf et l'immerger avec 1ml de solution de lyse, puis incubé une nuit à 4°C sous agitation.
- 7- Remplacer la solution de lyse par 1 ml de solution ESP. Incuber une nuit à 55°C sous agitation.
- 8- Laisser refroidir à 4°C puis laver les blocs 5 à 6 fois pendant une heure en tampon TE. A cette étape il y'a possibilité de stockage des blocs à 4°C dans 1 ml de TE.

✓ Digestion

- 1- Laver les blocs pendant 15 min dans 1 ml d'eau distillée à 37°C avec agitation, refaire le lavage 3 fois.
- 2- Laver les blocs pendant 1 h dans 20 μ l du tampon de l'enzyme [*ApaI*, BioRad, Mames la Coquete, France], à 37°C sous agitation.
- 3- Digérer les blocs dans 200 μ l d'eau distillée, 25 μ L de tampon de l'enzyme, 2 μ l d'enzyme (40U) et incubé 6h au bain marie à 37°C sous agitation.
- 4- Laver les blocs pendant 1h dans 1 ml de TE à 37°C.

✓ Migration

- 1- Placer les blocs sur les dents des peignes, laisser sécher à température ambiante.
- 2- Mettre le peigne en place et faire couler un gel d'agarose 1% (Ultra pure DNA grade Agarose, Bio-Rad), ainsi les blocs ont été scellés dans le gel.
- 3- La séparation des fragments d'ADN a été faite par l'appareil Gene PathTM System (Bio- Rad) selon le programme Eco. Les conditions de migration étaient les

Matériel et méthodes

suivantes: 14°C avec un voltage de 6V/cm pendant 20 h et un temps de pulse compris entre 5,3 et 49,9 s.

✓ Révélation

A la fin de la migration, le gel a été déposé dans un bain de BET pendant 5 minutes, puis dans du TBE 0,5X à 4°C pendant une nuit

La taille des différents fragments obtenus a été évaluée par comparaison au marqueur de taille Lambda Ladder Standard (BIO-Rad)

L'interprétation des résultats a été faite visuellement selon les critères de Van Belkum [Van Belkum et al., 2007]. Pour des pulsotypes contenant au moins 10 fragments distincts. Après avoir identifié le profil épidémique (profil commun), tous les autres profils ont été comparés à ce dernier. Les profils qui étaient nettement différents du profil épidémique (-50% des fragments en commun), étaient considérés comme génétiquement non reliés.

Lorsque le profil considéré était différent du profil épidémique de 4 à 6 bandes, les deux isolats étaient considérés comme génétiquement reliés.

Une souche était considérée comme très reliée à la souche épidermique, si son profil diffère de 2 à 3 bandes. Cette différence correspond à des mutations ponctuelles au niveau de l'ADN, des délétions ou des insertions de site de restriction.

Résultats

1-Répartition des souches bactériennes selon leur isolement

Durant notre travail de Janvier 2010 jusqu'au Octobre 2011, un total de 95 bacille à Gram négatif (91,57%) et cocci à Gram positif (8,42%) ont été identifiés (Figure N°10), ils se répartissent en : 42 souches d'entérobactéries, 23 d'*A. baumannii*, 22 *P. aeruginosa* et 8 *Staphylococcus aureus* ont été recueillis au niveau du laboratoire central de microbiologie de CHU Dr Dorban Annaba.

La moitié des prélèvements positifs était des entérobactéries (44,21%), l'autre moitié était divisée entre *A. baumannii* (24,21%), *P. aeruginosa* (23,15%) et *S. aureus* (8,42%) (Figure N°11).

Parmi les 42 souches d'entérobactéries, la dominance a été attribuée à *Klebsiella pneumoniae* (54,76%), suivie par *Escherichia coli* (16,66%), *Proteus mirabilis* (9,52%) *Enterobacter cloacae* et *Serratia marcescens* (7,14%) et 2,38% pour *Providencia stuartii* et *Citrobacter freundii* (Figure 12).

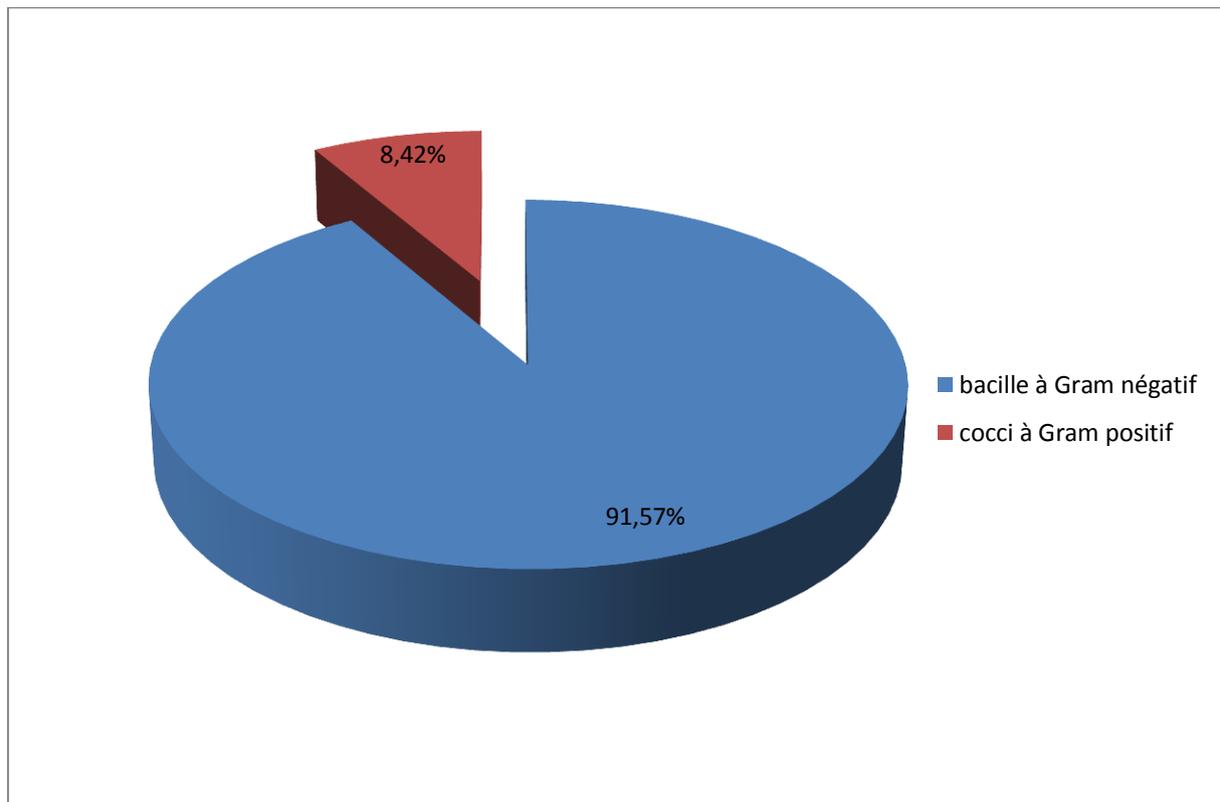


Figure N°10 : Répartition des bactéries selon le Gram

Résultats

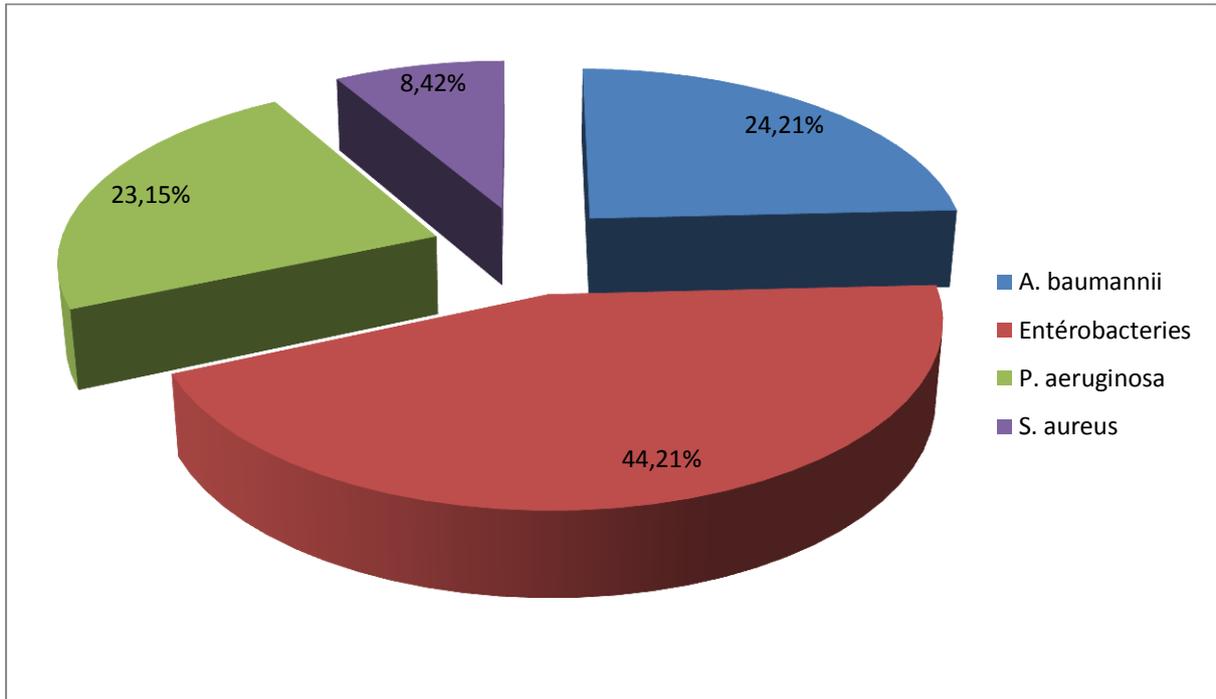


Figure N° 11 : Répartition des bactéries selon le pourcentage d'isolement

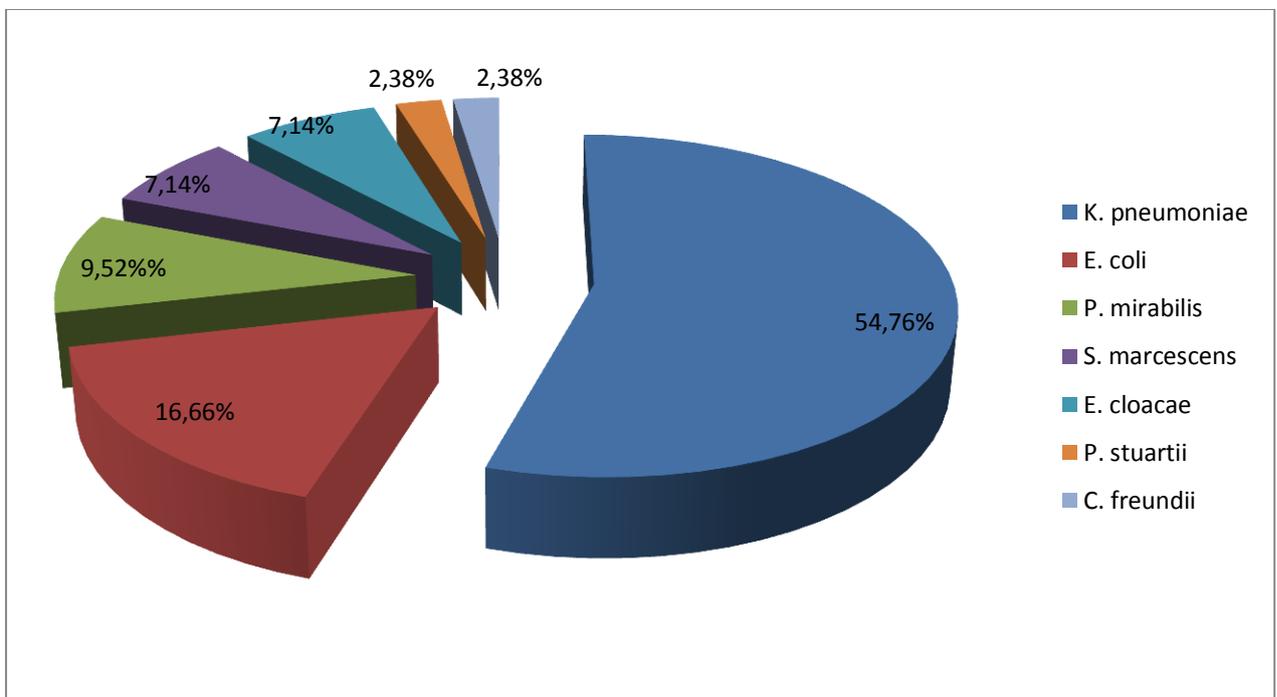


Figure N°12: Répartition des entérobactéries selon les espèces

Résultats

2-Etude phénotypique

2.1-Identification bactérienne

L'identification des souches d'entérobactérie a été confirmée par l'Api Système 20 E et l'Api Système 20NE pour les souches d'*A. baumannii* et Api Staph pour *S. aureus* avec le même biotype pour chaque espèce.

La recherche de la culture à différentes températures a été confirmée pour les 23 souches d'*A. baumannii* qui ont poussées à 44°C.

L'identification par spectromètre de masse MALDI-TOF-MS (Microflex), des 42 souches d'entérobactéries et des 23 souches d'*A. baumannii* isolées, a donné de très bon score de 1.9 et 2.4, dont les résultats se trouvent au niveau du tableau N°18.

Tableau N° 18: Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	ScoreValue	Organism (second best match)	ScoreValue
A1(-)(C)	A1	not reliable identification	1.27	not reliable identification	1.228
A2(-)(C)	A2	not reliable identification	1.311	not reliable identification	1.177
A3(+++)(B)	A3	Acinetobacter baumannii	2.4	Acinetobacter baumannii	2.399
A4(+++)(B)	A4	Acinetobacter baumannii	2.342	Acinetobacter baumannii	2.318
A7(++)(B)	A7	Serratia marcescens	1.935	Serratia ureilytica	1.916
A9(++)(A)	A9	Proteus mirabilis	2.279	Proteus mirabilis	2.186
A10(+++)(A)	A10	Proteus mirabilis	2.434	Proteus mirabilis	2.362
A11(+++)(A)	A11	Klebsiella pneumoniae	2.398	Klebsiella pneumoniae	2.29
C9(+++)(A)	C9	Escherichia coli	2.437	Escherichia coli	2.337
C10(+++)(B)	C10	Escherichia coli	2.422	Escherichia coli	2.281
C11(++)(A)	C11	Escherichia coli	2.082	Escherichia coli	1.99

Résultats

2.2-Etude de la sensibilité aux antibiotiques

2.2.1-Antibiogramme par diffusion de disques sur un milieu gélosé

- ✓ Les souches d'entérobactérie ont présenté un haut niveau de résistance au β -lactamines principalement les souches de *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae* (phénotype de BLSE), sauf pour les céphamycines (cefoxitine) et les cephèmes (céfepime) céphalosporine de 3^{ème} génération cependant aucune résistance n'a été détectée pour les carbapénemes (Imipenem) (Tableau N°19)
- *K. pneumoniae* a présenté un taux élevé de résistance au β -lactamines, 95,23% sont résistantes aux C3G (Cefotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime), cependant aucune résistance n'a été détectée pour l'Imipineme. Les *K. pneumoniae* ont un haut niveau de résistance pour les Aminosides 91,30% pour Tobramycine et 78,26% l'Amikacine. 39,13 résistent au ciprofloxacine (Tableau N°19).
- Chez *E. coli* 42,85% sont résistantes à la céphalosporine 3^{eme} génération. Aucune résistance n'a été détectée pour l'Imipinem, la Cefepime et la Gentamicine, 28,57%) résistent au Ciprofloxacine.
- 66,66% d'*E. cloacae* sont résistantes au céphalosporine 3^{ème} génération, aucune souche n'a présenté une résistance à l'Imipineme et Gentamicine.
- Aucune souche de *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* n'est résistante aux céphalosporines 3^{ème} génération, Imipineme, Ciprofloxacine et Gentamicine.

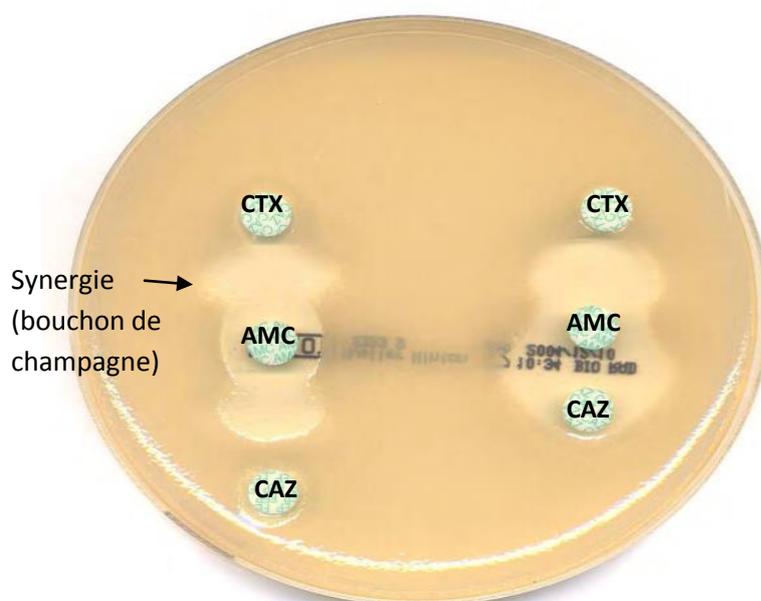
Résultats

Tableau N°19 : Profil de résistance des Entérobactéries aux antibiotiques

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Charge (µg)	Résistance aux antibiotiques				
			<i>k. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. marcescens</i>
β-lactamines	Ticarcilline	75	100%	100%	100%	100%	100%
	Ampicilline	10	100%	100%	100%	100%	100%
	Ampicilline + acide clavulanique	20/10	78,26%	71,42%	66,66%	0%	50%
	Ticarcilline + acide Clavulanique	75/10	100%	100%	33,33%	25%	100%
	Ceftazidime	30	95,23%	42,85%	66,66%	0%	0%
	Cefotaxime	30	95,23%	42,85%	66,66%	0%	0%
	Ceftriaxone	30	95,23%	42,85%	66,66%	0%	0%
	Imipinem	10	0%	0%	0%	0%	0%
Aminosides	Cefoxitine	30	0%	0%	100%	0%	0%
	Gentamicine	15	/	0%	/	0%	0%
	Amikacine	30	78,26%	0%	0%	0%	100%
Quinolones	Terramycine	10	91,30%	28,57%	66,66%	0%	0%
	Acide nalidixique	30	39,13%	43%	0%	25%	50%
Fosfomycine	Ciprofloxacine	5	39,13%	28,57%	0%	0%	0%
Autre	Fosfomycine	50	0%	0%	0%	0%	0%
	Tetracycline	30	21,73%	71,42%	66,66%	100%	0%
	Chloramphénicol	30	4,34%	14,28	66,66%	0%	0%
	Triméthoprime sulfaméthaxazole	1.25/23.75	60,86%	100%	66,66%	25%	0%

Résultats

Le dépistage systématique des souches productrices de BLSE selon la technique de test de synergie de double disque sur milieu gélosé, le résultat positif a été interprété par l'appariation de synergie entre les disques d'antibiotique (bouchon de champagne), a permis de détecter que 86.95 % (20/23) des *K. pneumoniae*, 33,33 % (2/6) des *E. coli* et 66.66% (2/3) des *E. cloacae* étaient productrices de BLSE (Figure N°13).



CTX : Cefotaxime, CAZ : Ceftazidime, AMC : Ampicilline + acide clavulanique

Figure N°13 : Test de synergie double disque pour confirmation de BLSE chez une souche *E. coli*

- ✓ L'antibiogramme des souches d'*A. baumannii*, montre des niveaux de résistances très élevés aux antibiotiques testés, particulièrement aux β -lactamines de groupes cephépemes (Cefepime 100%), pénames, monobactames et une résistance aux carbapénemes de 91,30% et aux quinolones (86,95%), reste en moyenne de 47,51% aux aminoside, aucune résistance n'est détectée aux Colistine et Netilmicine (Tableau N°20).
- ✓ La résistance des souches de *P. aeruginosa* reste relativement faible à tous les antibiotiques testés dans cette étude, reste en moyenne de 22.21% aux β -lactamines, aucune résistance est détectée pour les carbapénemes et polymexine, 23.80% des souches sont résistantes aux aminosides et quinolones et relativement élevé pour les Fosfomycine (61.90%) (Tableau N°20).

Résultats

Tableau N° 20 : Profil de résistance des *A. baumannii* et *P. aeruginosa* aux antibiotiques

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Charge (µg)	Résistance aux antibiotiques %	
			<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
β-lactamines	Ticarcilline	75	91.30	33.33
	Piperacilline	75	91.30	14.28
	Piperacilline +Tazobactam	75	91.30	4.76
	Ticarcilline +acide clavulanique	75/10	91.30	28.57
	Ceftazidime	30	100	28.57
	Aztréonam	30	95.65	23.80
	Imipiném	10	91,30	0
	Cefepime	30	100	/
Aminosides	Gentamicine	15	73	23.80
	Amikacine	30	43.47	0
	Terramycine	10	26.08	/
Quinolones	Acide nalidixique	30	86.95	/
	Ciprofloxacine	5	86.95	23.80
Polymexine	Colistine	50	0	0
Fosfomycine	Fosfomycine	50	/	61.90
	Netilmicine	30	0	9.52
	Chloramphénicol	30	/	33.33
	Triméthoprime sulfaméthaxazole	1.25/23.75	100	/

Résultats

- ✓ La résistance des *S. aureus* est élevée au β -lactamines et aux aminosides 75% pour la Gentamicine, mais faible aux quinolones 23% résistent aux Ciprofloxacine et aussi au Triméthopriime/sulfaméthaxazole (37,50%) (Figure N° 14).

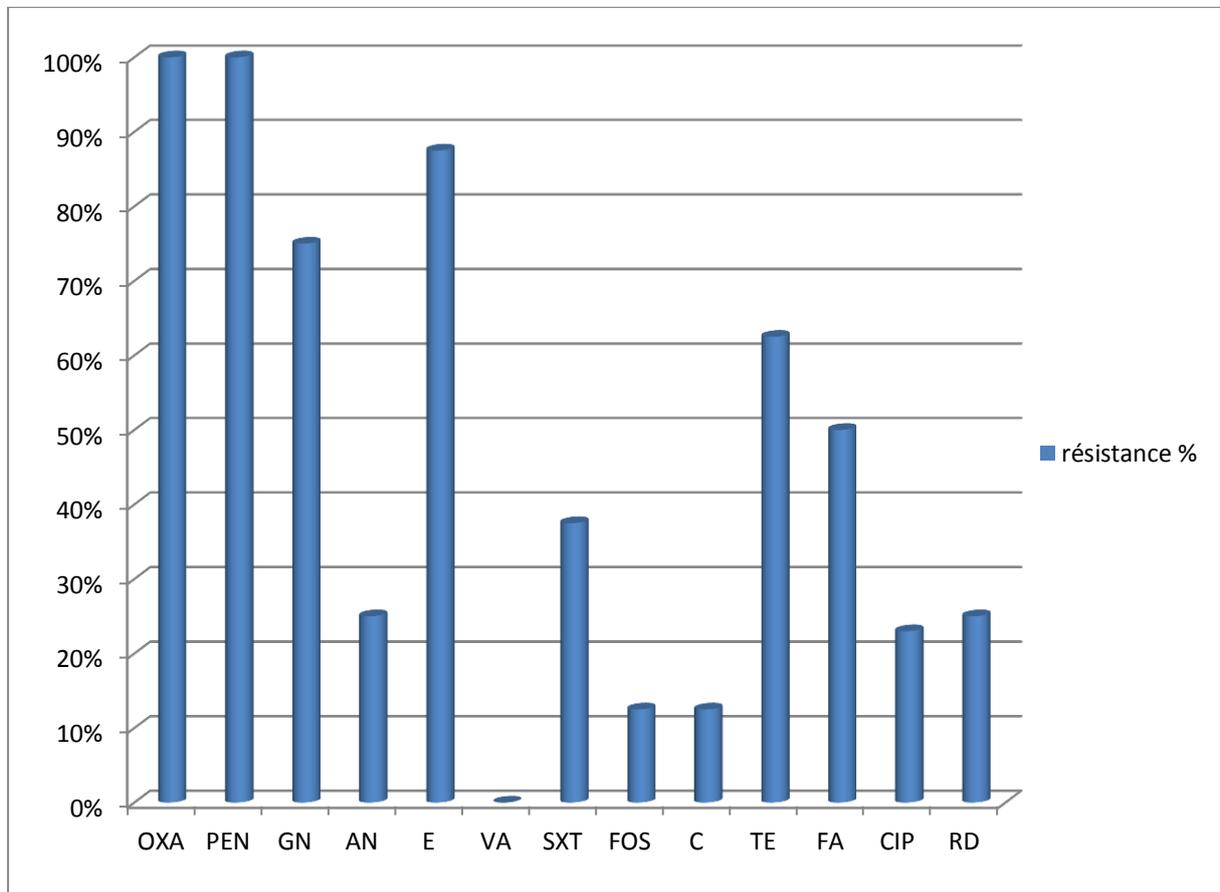


Figure N° 14 : Pourcentage de résistance des *S. aureus* aux antibiotiques

OXA : Oxacilline, PEN: Penicilline, GN : Gentamicine, AN : Amikacine, E: Erythromycine, VA : Vancomycine, SXT : Triméthopriime/sulfaméthaxazole, FOS: Fosfomycine, C: Chloramphénicol, TE : Tétracycline, FA : Acide fusidique, CIP : Ciprofloxacine, RD : Rifampicine.

Résultats

Le test de screening montre que les *S. aureus* résistants à l'oxacilline qui remplace la méthicilline in vitro (MRSA) sont présentés dans 37,5% (3/8) des souches.

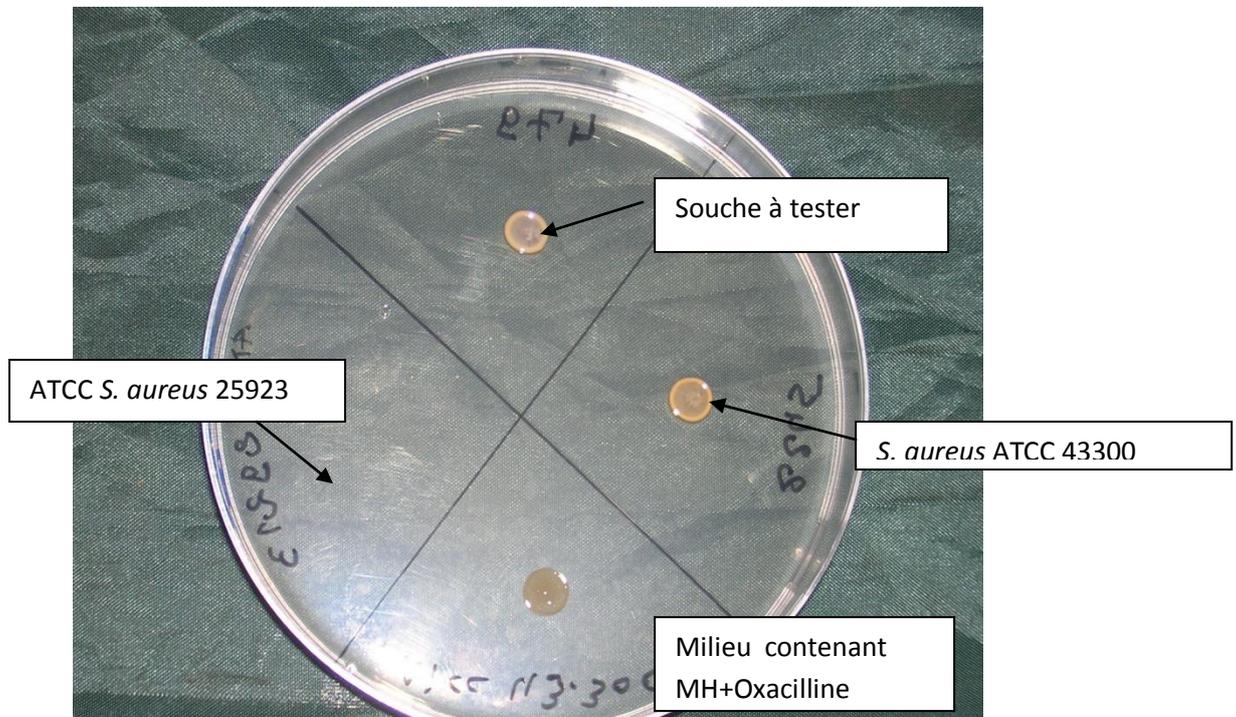


Figure N° 15: teste de screening de *staphylococcus aureus*

Nous remarquons la présence d'une culture d'une plus de colonie dans les zones des souches testées et aussi dans le témoin positif qui est la souche de référence *S. aureus* ATCC 43300 résistante à l'oxacilline.

Une absence de culture dans la zone du témoin négatif *S. aureus* ATCC 25923 sensible à l'oxacilline.

Résultats

2.2.2-Détermination des concentrations minimales inhibitrices par méthode de dilution en milieu gélosé

Les concentrations minimales inhibitrices ont été testées pour les entérobactéries qui ont un phénotype BLSE. Les résultats de CMI ont confirmé le taux de résistance des entérobactéries aux antibiotiques par la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé (Figure N°16).

Par définition la CMI₅₀ est la plus petite concentration d'antibiotique permettant d'inhiber la croissance de 50% des souches d'une espèce bactérienne.

Les CMI₅₀ des entérobactéries ont montré que pour la Ticarcilline et Céfotaxime les valeurs étaient toujours élevées : ≥ 4048 mg/l, elles baissent en ajoutant l'acide clavulanique : 128mg/l pour Ticacilline + acide clavulanique, 0.125 mg/l pour Cefotaxime + acide clavulanique, cependant la CMI₅₀ reste moyenne pour la Ceftazidime (128 mg/l), elle diminue en ajoutant l'acide clavulanique à 0,5mg/l (Tableau N°21)

Les MIC₅₀ obtenues pour les souches d'*A. baumannii* confirment le haut niveau de résistance aux antibiotiques: MIC₅₀ Ceftazidime ≥ 2048 μ g/ml, MIC₅₀ Ticarcilline ≥ 2048 μ g/ml, MIC₅₀ Ticarcilline / acide clavulanique ≥ 1024 μ g/ml, MIC₅₀ aztreoname = 512 μ g/ml, MIC₅₀ Cefepime =256 μ g/ml, MIC₅₀ Meropenem = 32 μ g/ml et MIC₅₀ Imipenem =128 μ g/ml (Tableau N°22)

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

Les CMI par E-test ont été réalisées pour l'antibiotique Imipenème pour les 86.95% des *A. baumannii* résistants à l'Imipenème, toutes les souches ont présenté un taux très élevé de résistance à l'Imipenème ≥ 32 mg/l (Figure N°17).

Résultats

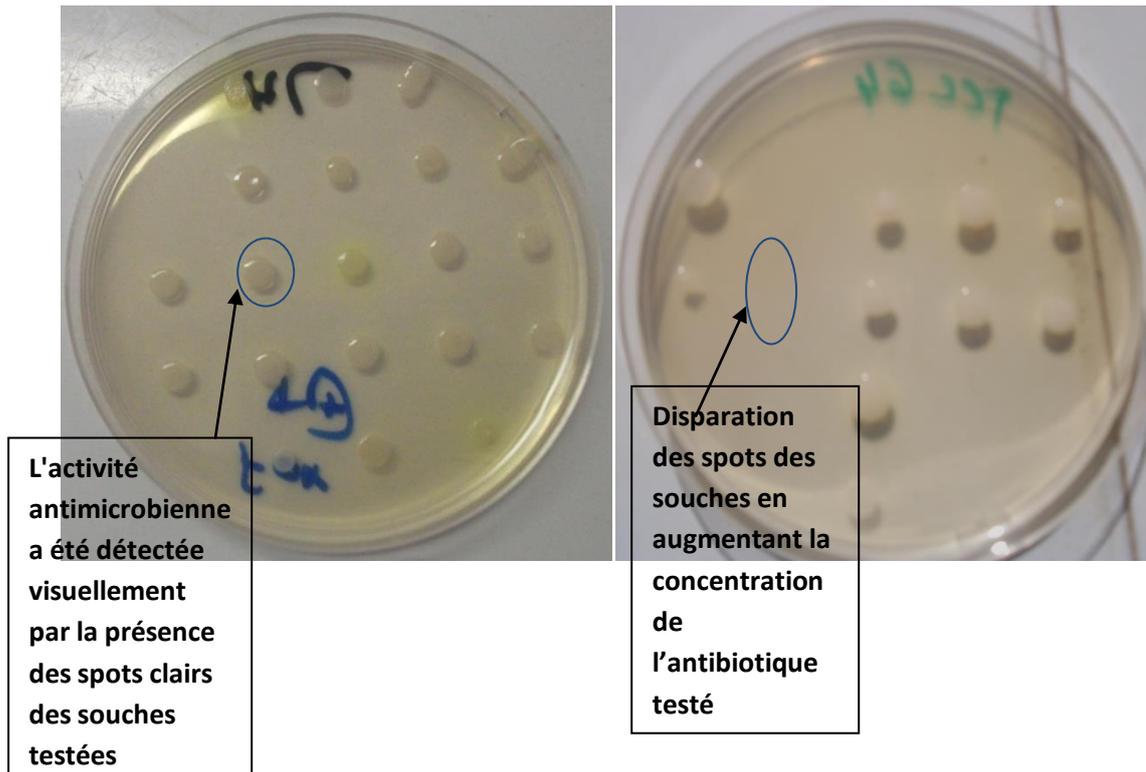


Figure N°16: Détermination des CMI par méthode de dilution en milieu solide

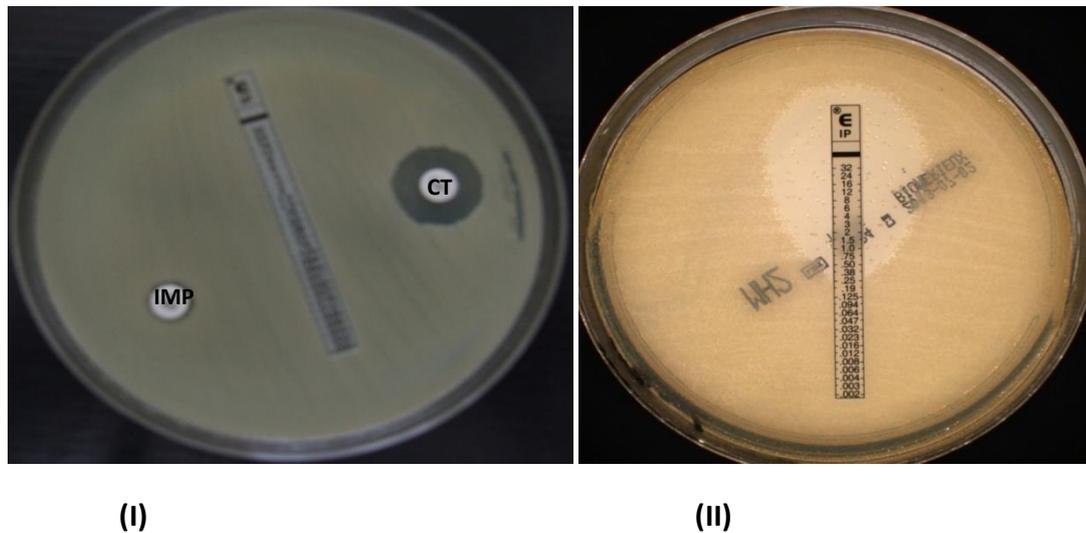


Figure N°17 : CMI par E-test Imipénème : (I) E-test Imipénème d'une souche d'*A. baumannii* résistante (II) E-test Imipénème d'une souche *A. baumannii* sensible, CT : colistine ; IMP : Imipénème

Résultats

Tableau N°21 : Etude des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes souches d'entérobactéries (phénotype BLSE)

N° des souches	Espèce bactérienne	CMI (µg/ml) des antibiotiques testés					
		CAZ	CAZ+AC	TIC	TCC	CTX	CTX+AC
K9	<i>K. pneumoniae</i>	256	1	>2048	1024	2048	0.125
K10		32	0.03	>2048	64	512	0.03
K11		32	0.5	>2048	32	256	0.03
K6		1024	1024	024	1024	2048	2048
K2		128	0.25	>2048	128	2048	0.06
K5		256	0.25	>2048	64	2048	0.015
K7		128	1	>2048	128	>2048	8
K13		256	0.5	>2048	128	>2048	0.25
K3		512	4	>2048	512	>2048	2
K12		32	0.03	>2048	128	2048	0.125
K14		128	1	>2048	1024	2048	0.125
K15		1024	1024	>2048	64	>2048	0.03
K8		1024	0.25	>2048	512	2048	8
K17		32	0.5	>2048	1024	256	0.06
K18		128	0.25	>2048	1024	2048	00.03
K19		128	0.25	>2048	128	>2048	8
K20		256	0.03	>2048	128	2048	2048
K21		256	0.5	>2048	1024	256	0.03
K22		512	4	>2048	128	2048	0.03
E6		<i>E. coli</i>	32	0.25	256	16	2048
E4	64		64	2048	2048	2048	2048
E5	32		0.5	1024	8	2048	0.03
En3	<i>E. cloacea</i>	64	0.5	2048	32	512	0.03
En2		64	4	>2048	128	2048	4

TIC : Ticarcilline, CTX : Céfotaxime, TCC : Ticacilline + acide clavulanique, CTX+AC : Cefotaxime + acide clavulanique, CAZ : Ceftazidime, CAZ/AC : Ceftazidime + l'acide clavulanique.

Résultats

Tableau N°22 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices des souches d'*Acinetobacter baumannii*

N° des souches	CMI (µg/ml) des antibiotiques testés						
	TIC	TCC	CAZ	FEP	IMP	MER	AZT
1	2048	512	512	64	2	1	256
2	>2048	>1024	512	64	128	32	512
3	>2048	>1024	>2048	256	256	64	>512
4	2048	>1024	256	256	128	32	512
5	>2048	>1024	512	>512	128	32	512
6	1024	128	512	128	2	4	512
7	512	512	512	>512	64	16	512
8	>2048	>1024	>2048	256	>2048	64	16
9	1024	1024	256	256	128	32	>512
10	>2048	>1024	>2048	>512	64	16	>512
11	>2048	>1024	>2048	128	128	32	512
12	2048	>1024	>2048	>512	128	32	512
13	1024	1024	512	128	64	32	512
14	>2048	>1024	>2048	256	256	32	512
15	>2048	>1024	>2048	>512	256	64	512
16	2048	1024	>2048	>512	256	32	512
17	>2048	>1024	>2048	>512	256	64	512
18	>2048	>1024	256	128	256	32	512
19	2048	1024	256	256	128	32	512
20	>2048	>1024	>2048	64	128	64	512
21	2048	>1024	256	64	128	32	512
22	>2048	>1024	>2048	256	256	64	>512
23	512	512	>2048	512	128	32	16

CAZ: Ceftazidime, TIC: Ticarcilline, TIC/AC: Ticarcilline / acide clavulanique, ATM: Aztréoname, FEP: Cefepime, MER: Meropenem, IMP: Imipenem.

3-Etude moléculaire

3.1 Recherche des gènes codant pour les β -lactamases de classe A d'Ambler

Après la révélation des bandes d'ADN sur gel d'agarose par électrophorèse sous UV, les résultats de PCR standard (tableau N°23) montrent que :

- Sur les 42 souches d'entérobactérie,
 - ✓ 86,95% des souches de *K. pneumoniae* (20/23) sont porteuses du gène *bla*_{CTX-M-15} (Figure N° 19).
 - ✓ 38% des souches hébergent le gène de *bla*_{SHV-12} et 23.80% hébergent le gène *bla*_{SHV-11} (Figure N°18).
 - ✓ Seulement deux souches (*K. pneumoniae*) étaient porteuses du gène de *bla*_{TEM-1} (Figure N° 20).
 - ✓ Aucune souche ne possède le gène *bla*_{PER}.
- Le seul gène codant pour les β -lactamases de classe A chez les souches d'*A. baumannii* est *bla*_{TEM-1} détecté chez trois souches.

Résultats

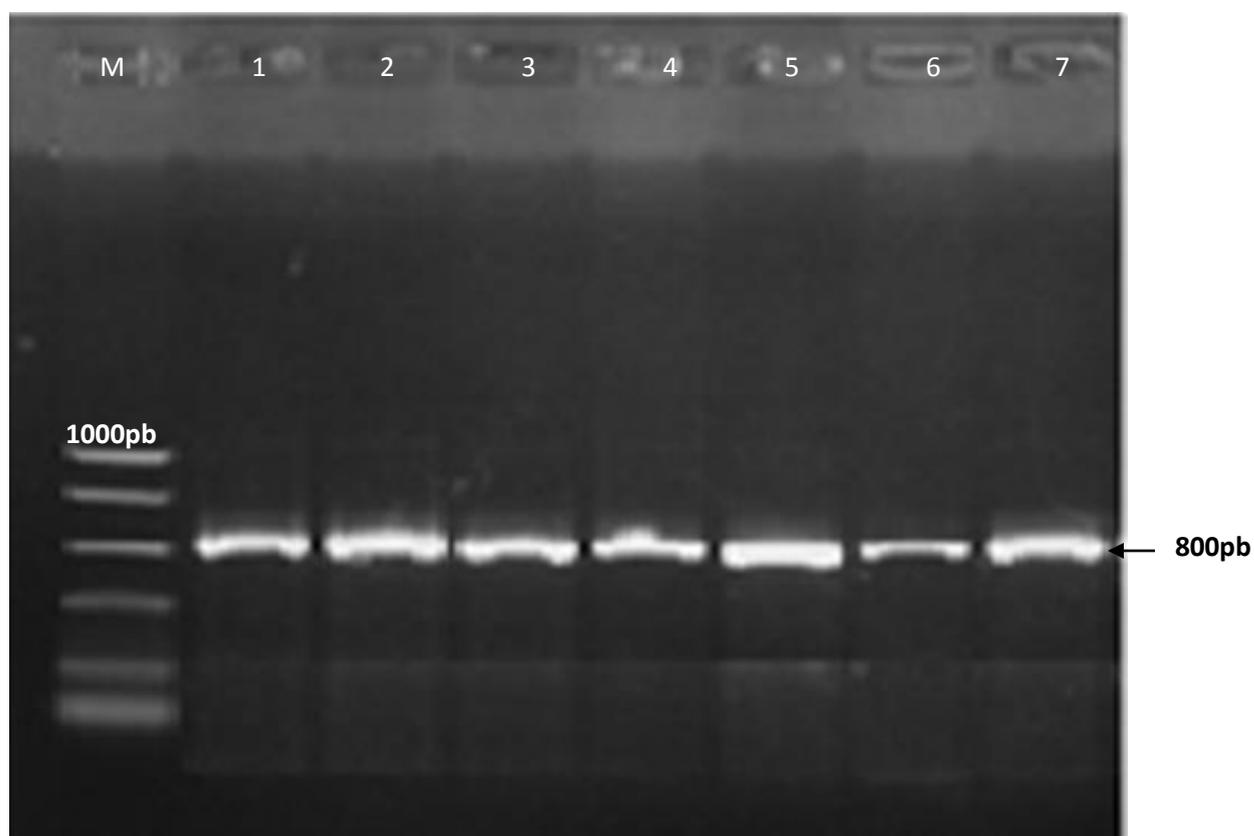


Figure N°18 : Profil de migration par électrophorèse des produits de PCR de *bla*_{SHV}.
M: marqueur de taille 1000 pb DNA Ladder (Promega) , puits 1 : contrôle positif

Résultats

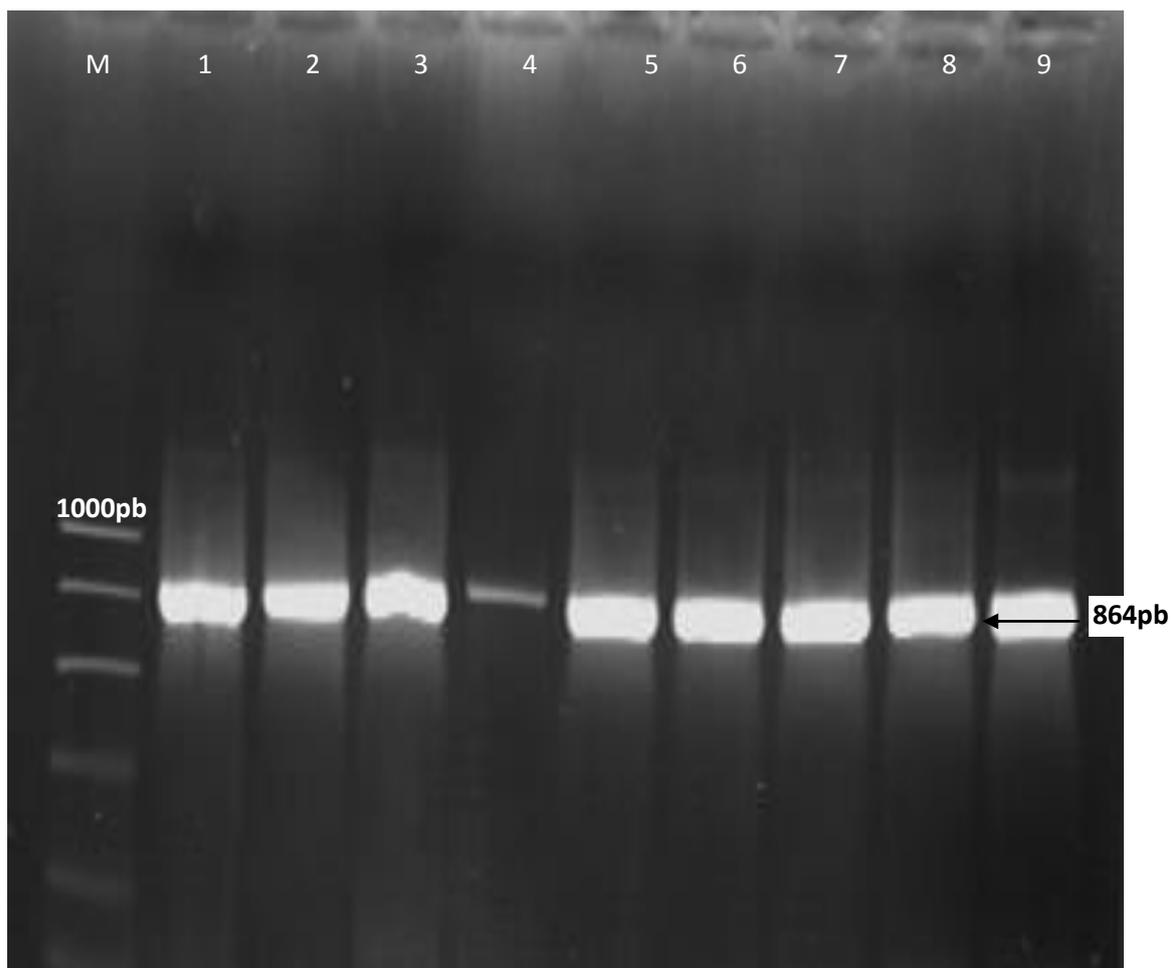


Figure N°19: Profil de migration par électrophorèse des produits de PCR de *bla*_{CTX-M}
. M: marqueur de taille 1000 pb DNA Ladder (Promega), puits 1 : contrôle positif

Résultats

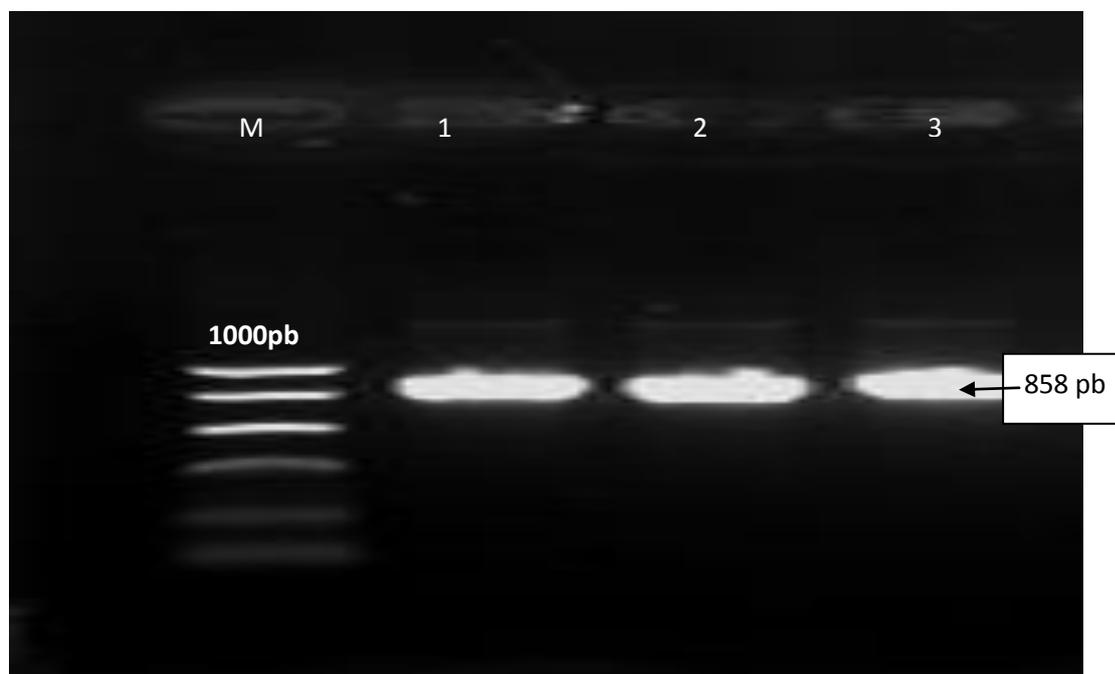


Figure N°20 : Profil de migration par électrophorèse des produits de PCR des gènes *bla*_{TEM}. M: marqueur de taille 1000 pb DNA Ladder (Promega), puits 1 : contrôle positif

3.2-Recherche des genes codants pour les carbapénemase par PCR

Tous les produits de PCR standard positifs ont été confirmés par la PCR en temps réel, cette dernière reste une technique plus efficace, précise et rapide mais couteuse (TableauN°24):

- Toutes les souches étaient positives pour l'endogène *bla*_{OXA-51} (Figure N° 21)
- Sur 23 souches d'*A. baumannii* 60.86% des souches (14/23) sont porteuses du gène *bla*_{OXA-23} (Figure N°22,23).dont deux souches contenaient à la fois *bla*_{OXA-23} et *bla*_{TEM-1} gènes.
- Une seule souche était productrice de New Delhi métallo-beta-lactamase *bla*_{NDM-1} (Figure N° 24,25).
- Une souche contenant à la fois *bla*_{OXA-24} (Figure N°27). et *bla*_{OXA-23}, une autre souche contenant à la fois *bla*_{OXA-58} (figure 26) et *bla*_{OXA-23}.

Résultats

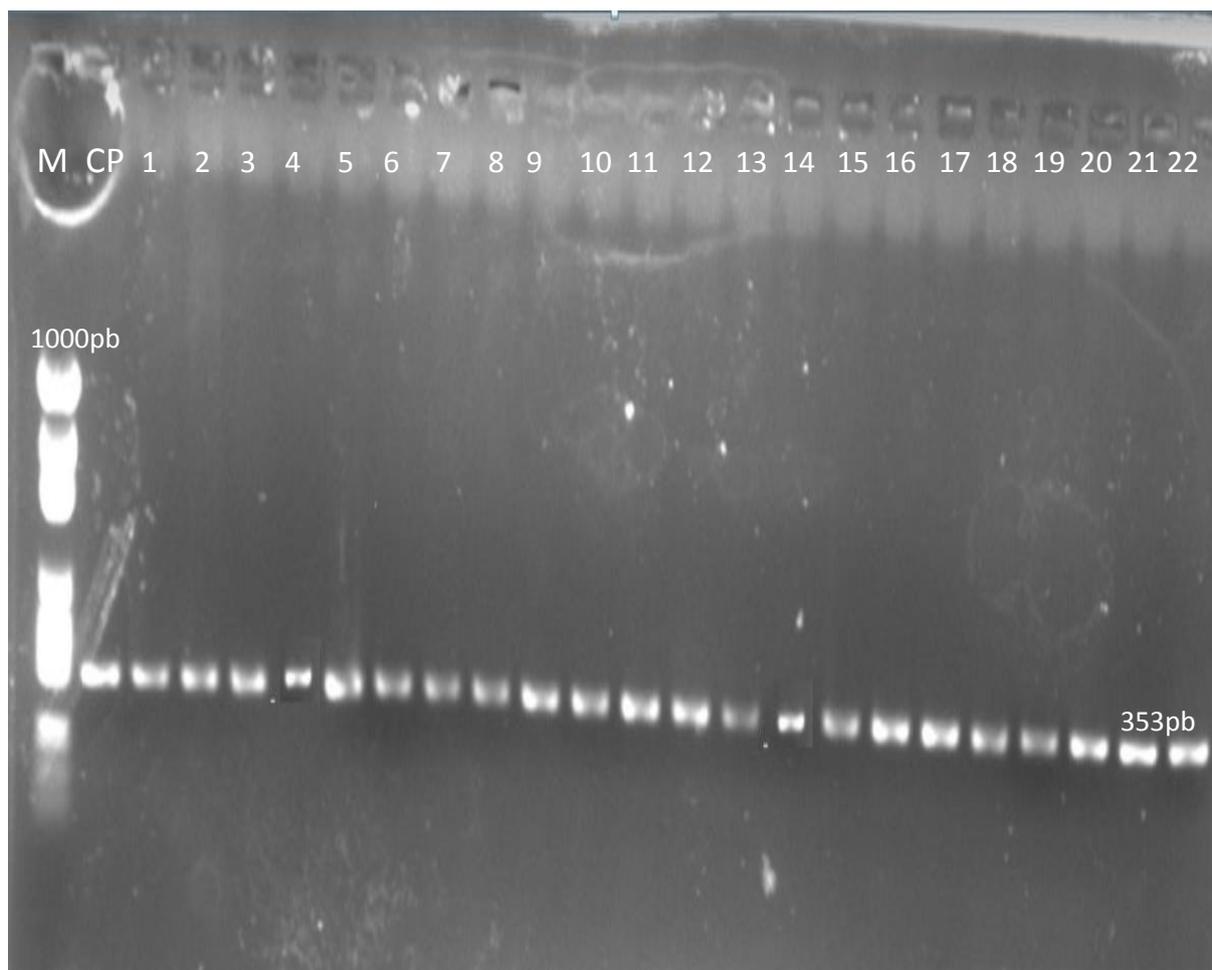


Figure N°21 : Amplification du gène *bla*_{OXA-51} par Polymerase Chain Reaction (PCR) standard, M : marqueur de taille 1000pb DNA ladder (Promega), CP : contrôle positif

Résultats

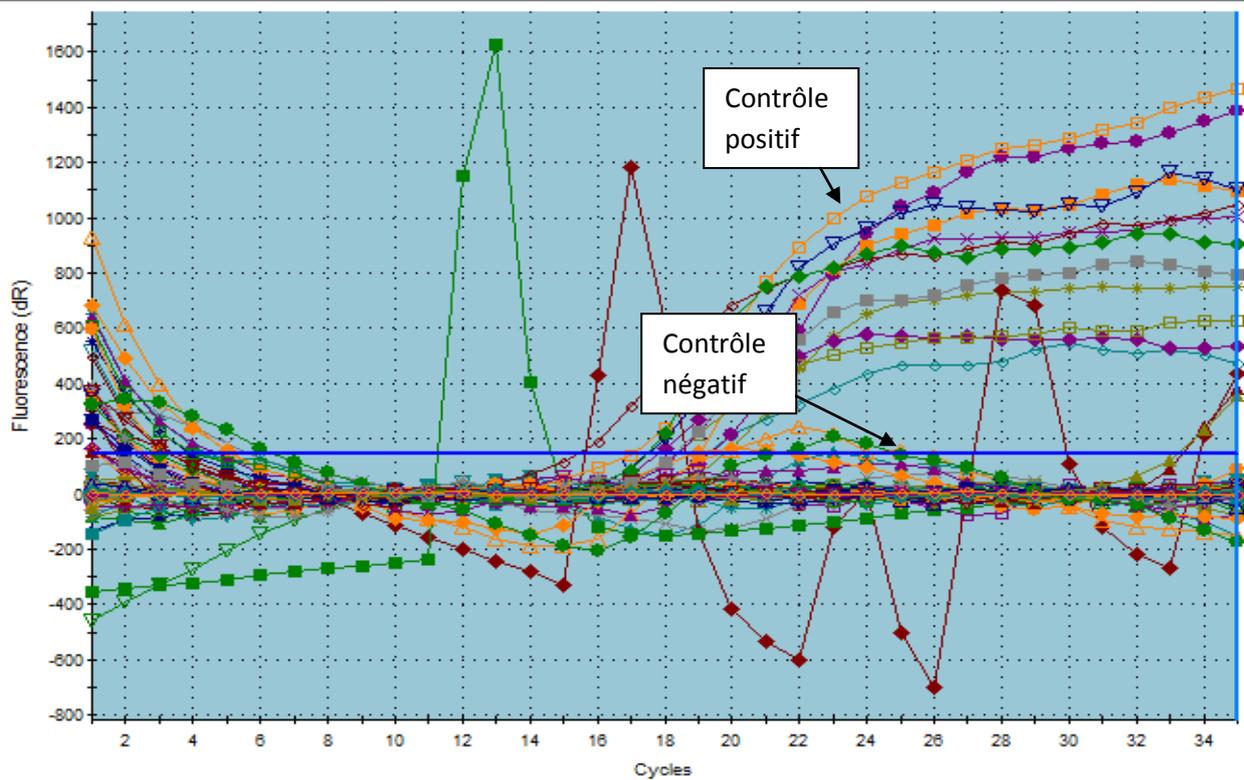


Figure N°22 : Amplification du gène *bla*_{OXA-23} par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

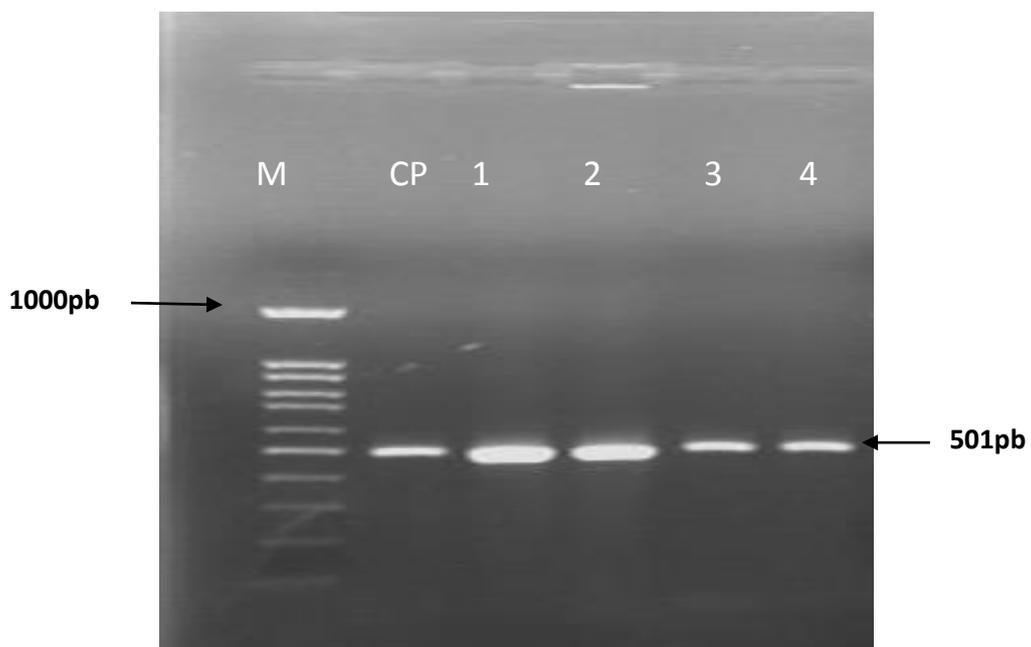


Figure N°23 : Amplification du gène *bla*_{OXA-23} par Polymerase Chain Reaction (PCR) standard, M : marqueur de taille 1000pb DNA ladder (Promega), CP : contrôle positif

Résultats

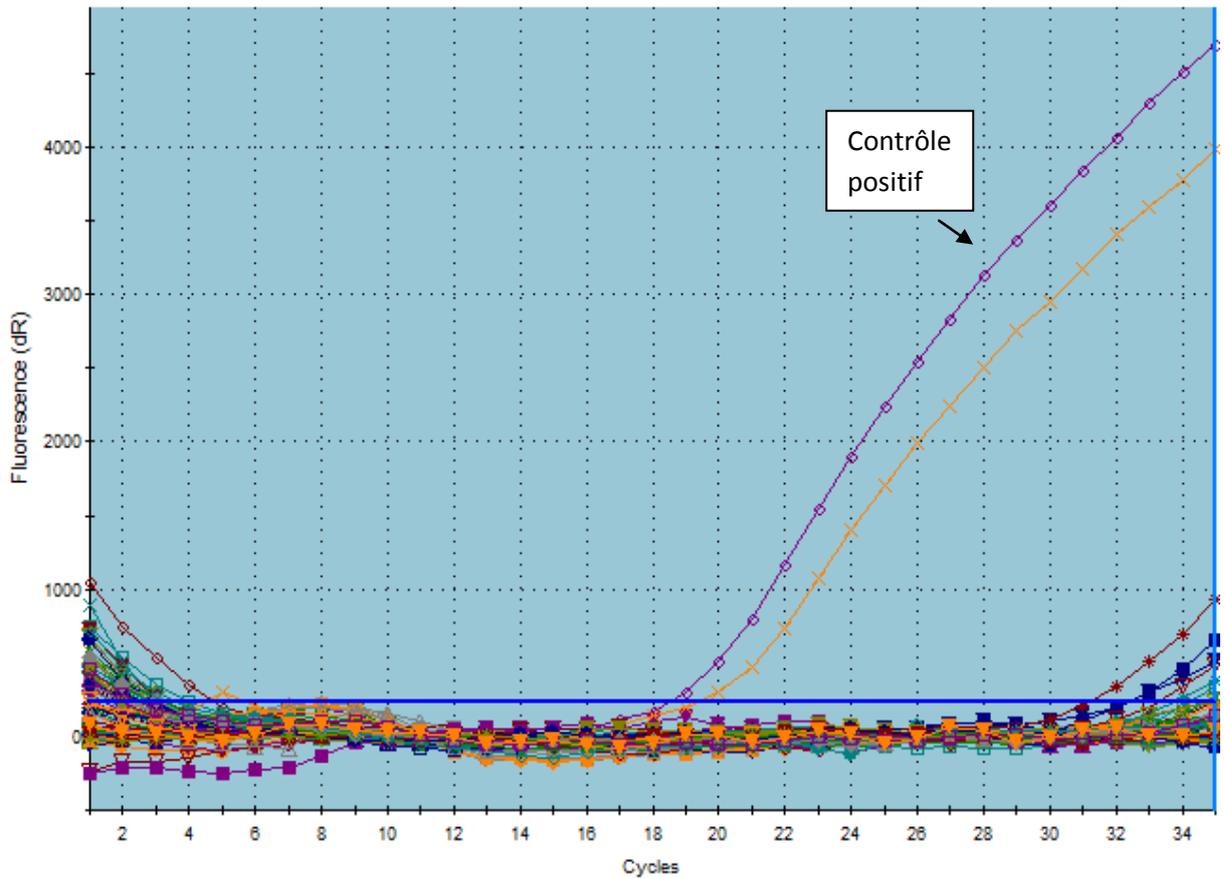


Figure N° 24: Amplification du gène bla_{NDM-1} par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

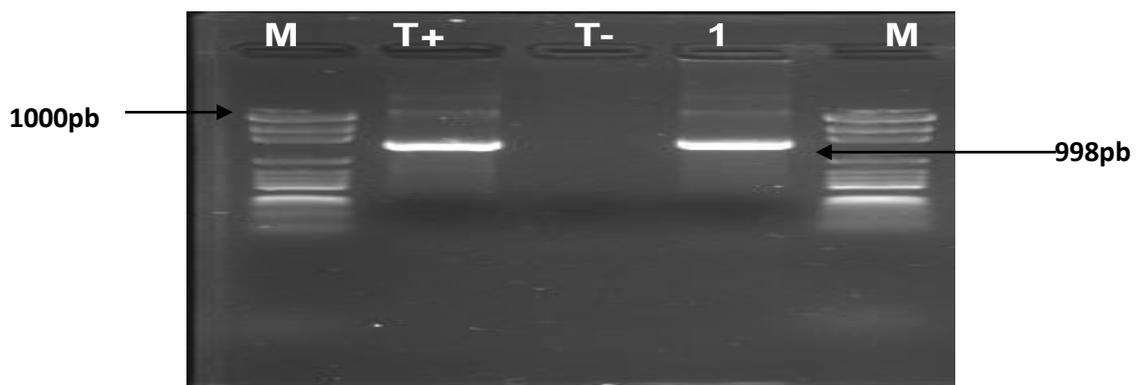


Figure N° 25 : Amplification du gène bla_{NDM-1} par Polymerase Chain Reaction (PCR) en standard, M : marqueur de taille 1000pb DNA ladder (Promega), T+ : témoin positif, T- : témoin négatif.

Résultats

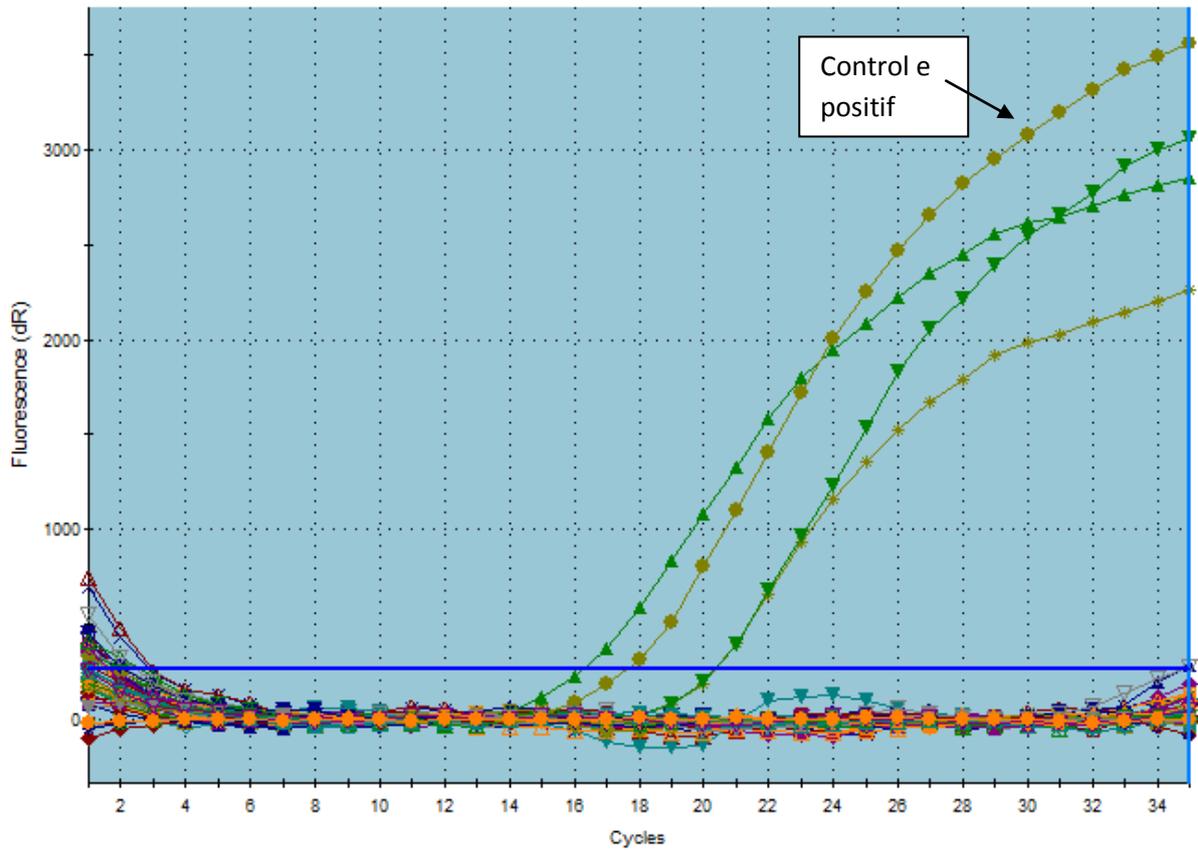


Figure N° 26 : Amplification du gène *bla*_{OXA-58} par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

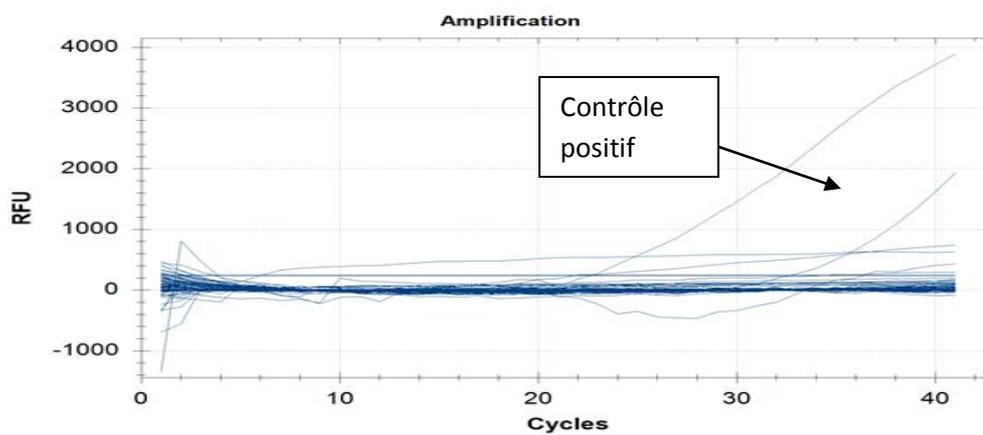


Figure N° 27: Amplification du gène *bla*_{OXA-24} par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

Résultats

3.3-Sequençage :

Les produits de PCR positifs ont été confirmés par le séquençage, les séquences ont été corrigées par le logiciel codon code aligneur. Après le blast avec le (GenBank Pubmed), toutes les souches ont présenté un 100% de similarité avec les espèces les plus proches

3.4-Typage moléculaire par Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

3.4.1-Enterobactérie

Le PFGE a été réalisé sur les souches hébergeant CTX-M et SHV, pour étudier la clonalité phylogénétique et la dissémination de ces gènes dans le service de la réanimation (Figure N°28).

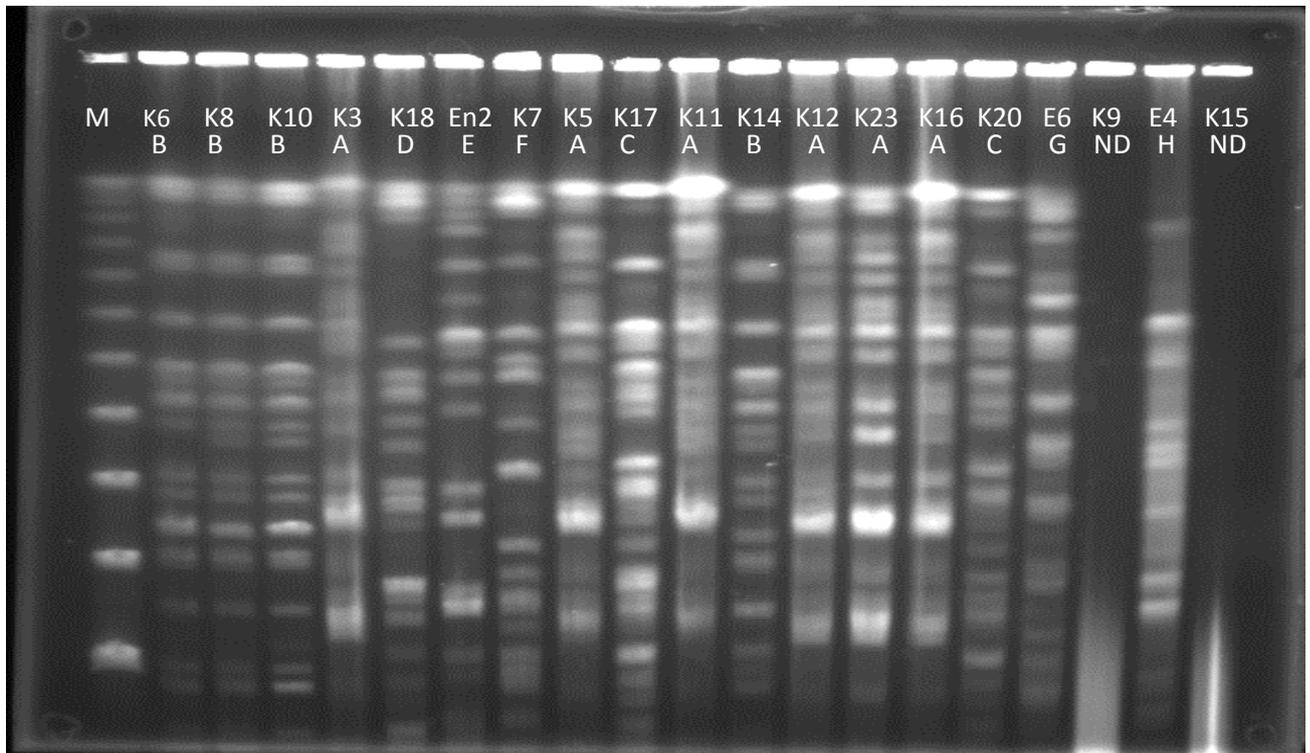


Figure N° 28: Electrophorèse en champs pulsé des ADN génomiques de 19 souches d'entérobactérie

Résultats

Tableau N° 23: Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches d'entérobactérie

N° de Souche	Espèce bactérienne	Age (Ans)	sexe	Date d'isolement	Profil génotypique	PFGE
K1	<i>K. pneumoniae</i>	52	M	06/09/2010	SHV-11	
K2		06 J	M	29/03/2010	CTX-M15+SHV-11	
K3		37	F	11/05/2010	CTX-M15+SHV-11	A
K4		30	F	06/06/2010	SHV11	
K5		34	M	17/06/2010	CTX-M15+SHV-12	A
K6		45	F	29/06/2010	CTX-M15+SHV-11	B
K7		05	M	29/06/2010	CTX-M15+SHV-12	F
K8		28	M	26/06/2011	CTX-M15+SHV-11	B
K9		28	F	07/07/2011	CTX-M15+SHV-11	ND
K10		27	M	12/09/2010	CTX-M15+SHV-11	B
K11		59	M	12/10/10	CTX-M15+SHV-12	A
K12		58	M	17/02/2010	CTX-M15+SHV-11	A
K13		51	F	18/10/2011	CTX-M15+SHV-11	
K14		33	F	19/02/2010	CTX-M15+SHV-11	B
K15		10	M	02/03/2010	CTX-M15+SHV-12	ND
K16		22	F	02/02/2010	CTX-M15+SHV-12	A
K17		02	M	18/03/2010	CTXM15+SHV-12 +TEM-1	C
K18		20	F	05/02/2010	CTX-M15+SHV-12 +TEM-1	D
K19		76	M	21/03/2010	SHV-11	
K20		02 M	F	17/03/2010	CTX-M15+SHV-12	C
K21		28	M	31/01/2010	CTX-M15+SHV-11	
K22		13 J	M	14/02/2010	CTX-M15+SHV -11	
K23		22	F	16/03/010	CTX-M15+SHV-12	A
En1	<i>E. cloacae</i>	45	M	12/09/2010	/	
En2		23	M	24/03/2010	SHV-12	E
En3		27	F	27/07/2011	/	
E1	<i>E. coli</i>	52	F	02/08/2010	/	
E2		50	F	08/02/2010	/	
E3		52	F	25/03/2010	/	
E4		28	F	07/07/2011	/	
E5		43	F	20/07/2011	SHV-11	H
E6		26	F	13/05/2011	/	
E7		07	F	19/07/2011	SHV-11	G
S1	<i>S. marcescens</i>	11	M	15/09/2010	/	
S2		04	F	27/09/2010	/	
S3		54	M	23/03/2010	/	
P1	<i>P. proteus</i>	30	F	05/03/2010	/	
P2		07M	M	18/02/2010	/	
P3		32	F	19/10/2010	/	
P4		01	M	29/10/2010	/	

Résultats

Suite tableau N° 23: Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches d'entérobactérie

N° de souche	Espèce bactérienne	Age (ans)	sexe	Date d'isolement	Profil génotypique	PFGE
Pr1	<i>P. stuartii</i>	34	F	01/09/2010	/	
C1	<i>C. freundii</i>	66	F	03/06/2010	/	

M : male, F : femelle, ND : non déterminé, J : jour, M : mois.

Résultats

Parmi les 21 souches d'entérobactérie productrices de BLSE, seulement 19 ont été typés et 2 non typables par PFGE (Figure N° 28). Huit différents profils de A à H ont été détectés. Le génotype A était le cluster le plus commun (6/17), suivie par le cluster B (4/17), puis le cluster C (2/17). Toutes les souches de cluster A, B et C étaient des *K. pneumoniae* porteuses des gènes CTX-M15, SHV-11 et SHV-12 (Tableau N° 23).

3.4.2-*Acinetobacter baumannii*

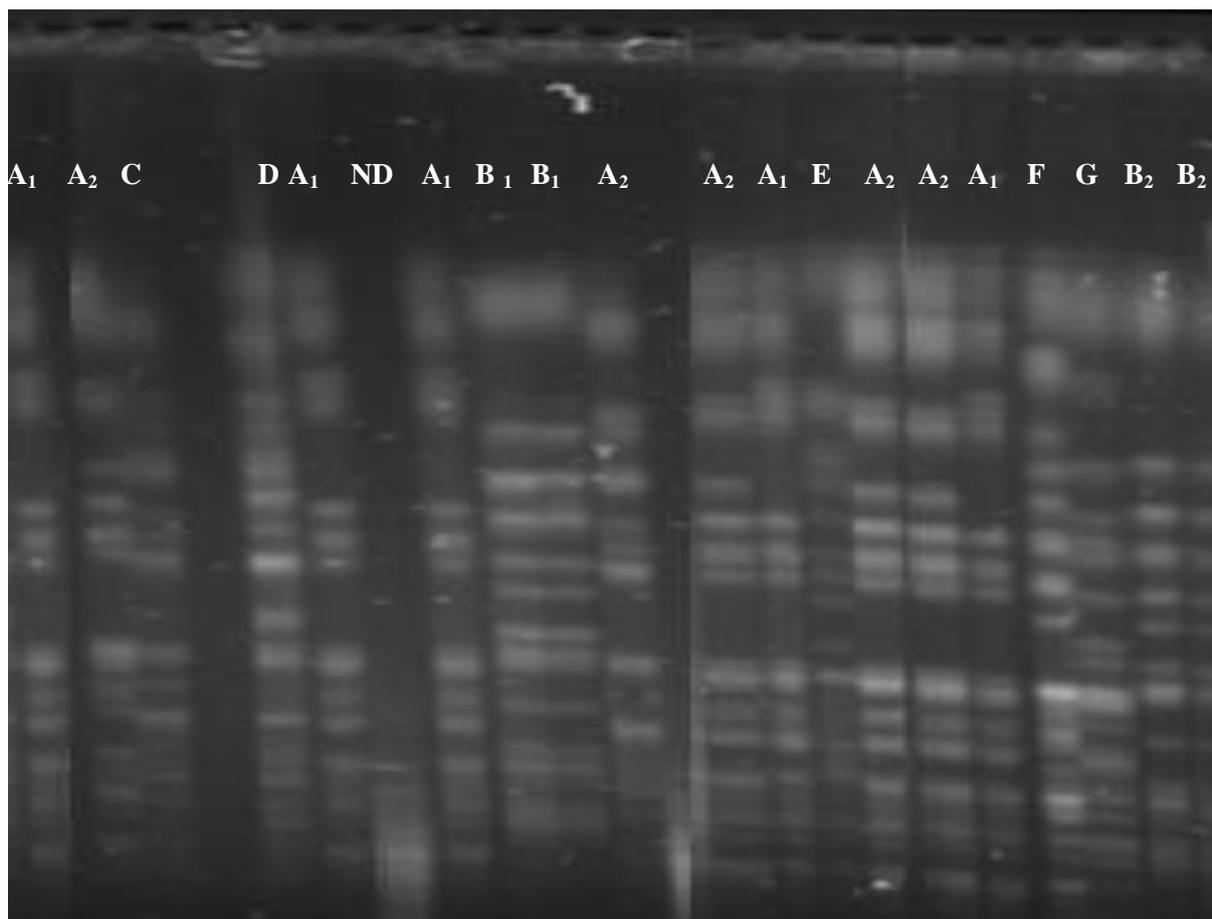


Figure N°29: Electrophorèse en champs pulse des ADN génomiques des 23 souches d'*A. baumannii*

Parmi les 23 souches, seulement 19 ont été typés par PFGE (figure N° 29). Sept profils différents ont été détectés. Les souches isolées à Hôpital Ibn Rochd ont montré trois profils différents des motifs (C, E et G). Cependant, dans l'hôpital Ibn Sina, quatre génotypes ont été identifiés (A, B, C et D); génotype A: A1 (n = 5) et A2 (n = 5) a été trouvé comme étant le plus commun cluster (10/16) avec 60% hébergeant le gène *bla_{OXA-23}*, suivie par B: B1 (n = 2) et B2 (n=2) (tableau N°24).

Résultats

Tableau N°24 : Caractères phénotypiques et génotypiques des 23 souches d'A.

baumanni

N° souche	Age	Sexe	Date d'isolement	Profil phénotypique	CMI IMP µg/ml	Profil génotypique	PFGE
1	5M	M	21/01/2010	TC- TCC-PIP- TZP-CAZ-ATM-FEP-GM	2	OXA-51+TEM-1	ND
2	14M	M	13/04/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -K-NA-CIP	>32	OXA-51	ND
3	4 M	F	29/06/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -AN-K-NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	E
4	2 M	F	18/11/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP GM- K	>32	OXA-51	G
5	6M	F	05/01/2011	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	C
6	38Y	F	17/01/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-ATM-FEP-GM- TM-K-NA-CIP	2	OXA-51	A ₁
7	89Y	M	19/01/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM	>32	OXA-51+OXA-23	A ₁
8	24Y	M	03/02/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM- AN-K -NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23+OXA-24	D
9	48Y	M	04/02/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	ND
10	20Y	F	15/02/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-K-NA-CIP	>32	OXA-51+NDM-1	B ₂
11	58Y	M	17/02/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-AN-K-NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	A ₁
12	56Y	M	08/03/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-TM-K- NA-CIP	>32	OXA-51+TEM-1+OXA-23	B ₁

Résultats

Suite tableau N°24 : Caractères phénotypiques et génotypiques des 23 souches d'A.

baumanni

13	52Y	M	09/03/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-TM-K-NA-CIP	>32	OXA-51	B ₁
14	74Y	M	22/04/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-AN-K-NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	ND
15	35Y	M	25/05/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-AN-K -NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	A ₂
16	71Y	M	13/06/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-K-NA-CIP	>32	OXA-51+TEM- 1+OXA-23	A ₂
17	34Y	M	17/06/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -AN-K--NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	A ₁
18	29Y	F	06/09/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	A ₂
19	63Y	M	24/10/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -NA-CIP	>32	OXA-51	A ₂
20	92Y	M	07/11/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -AN-K-NA-CIP	>32	OXA-51	A ₁
21	21Y	M	07/11/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -TM-AN-K-NA-CIP	>32	OXA-51+OXA-23	F
22	73Y	M	19/11/2010	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-AN-K-NA-CIP	>32	OXA-51+OXA- 23+OXA-58	A ₂
23	32Y	F	01/05/2011	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ--IMP-MER- ATM- FEP -GM-TM-AN-K-NA-CIP	>32	OXA-51	B ₂

TIC, ticarcilline; TCC, ticarcilline- acide clavulanique; PIP, piperacilline; TZP, piperacilline-tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; ATM, aztreonam; GM, gentamicine; TM, tobramycine; AN, amikacine; K, kanamycine; NA, acide nalidixique; CIP, ciprofloxacine, M : male, F : femelle, ND : non déterminé.

Discussion

Discussion

Les infections respiratoires basses (IRB), représentent un problème majeur de santé publique de par leur fréquence, leur morbidité, leur mortalité et leur cout socio-économique. La pneumonie est l'infection la plus fréquente, en particulier chez les patients ventilés mécaniquement [Corbella et al., 2000].

Les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique aussi bien par la variété des espèces bactériennes qui les composent et leur fréquence au niveau de la santé des populations.

Au cours des dernières années, Plusieurs rapports ont montré la faisabilité de l'utilisation assistée par matrice désorption-ionisation laser (MALDI) à temps de vol (TOF) de masse spectrométrie de masse (MS) afin d'identifier rapidement les micro-organismes [Sauer et al., 2010]. Ce sont que quelques études qui ont évalué cette méthode comme une rapide Pour classer les espèces bactériennes [Seng., et al 2010, Murray et al., 2010] Cependant, il y'a des exemples récents de l'utilisation de MALDI-TOF MS pour l'identification rapide et de typage d'un nombre limité de souches cliniques, tels que *Streptococcus pyogenes* [Wang et al., 2010], *Klebsiella pneumoniae* [Berrazeg et al., 2013a] et *Acinetobacter baumannii* [Kempf et al., 2012b]

La fréquence des bacilles à Gram négatif est le témoin d'une forte contamination de l'environnement hospitalier par ces bactéries et de l'inefficacité des mesures visant à limiter leur dissémination.

Dans notre étude les entérobactéries représentent 44,21% des germes isolés, un pourcentage de 40% a été reporté dans la littérature [Von Baum et al., 2010] avec une prédominance de *Klebsiella pneumoniae* 54,76% ce qui a été confirmé par une étude Brésilienne [Wolf et al., 2001], suivie de *Escherichia coli* (16,66%), *Proteus mirabilis* (9,52%) et 7,14% d'*Enterobacter cloacae* et *Serratia marcescens* contrairement à cette étude brésilienne qui a montré un grand pourcentage d'*Enterobacter cloacae* par rapport à *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires présentent une fréquence respectivement 24,21 % 23.15% d'*Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* contrairement à la littérature ou *A. baumannii* était le germe le plus isolé suivi de *P. aeruginosa* et *K. pneumniae* [Wei et al., 2013 ; Li et al., 2013 ; Wolf

Discussion

et al., 2001]. Cependant, *S. aureus* est identifié chez seulement 8,42% de nos souches, cette fréquence est très proche de celle rapportée en Turquie (8,7%) des souches isolées des pneumonies nosocomiales [Dogru et al., 2010]

Les bacilles à Gram négatif ont été collectés des patients de différents âge et sexe dans notre étude le sexe masculin est le prédominant chez les patients infectés par les bacilles à Gram négatif non fermentaire *Acinetobacter baumannii* (Male=16, Femelle=7), *Pseudomonas aeruginosa* (Male =19, Femelle =6), contrairement aux entérobactéries ou le sexe féminin est le prédominant (Male = 19 , Femelle = 23), les adultes sont la tranche la plus concernée par les infections respiratoires basses : entérobactéries (Adulte=31, Enfant=11), *A. baumannii* (Adulte :18, Enfant : 5) *P. aeruginosa* (Adulte =17, Enfant :5).

En réponse à l'augmentation des résistances chez les cocci à Gram positif, entérocoque résistant à la Vancomycine (ERV) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) des molécules originales ont été mises sur le marché. L'attention de la communauté scientifique a été focalisée sur le SARM, peut-être aux dépens des bacilles à Gram négatif multi-résistants aux antibiotiques (BGN-MR).

Les premières alertes sont arrivées au début des années 2000 [Bratu et al., 2005], à la fin de la décennie une évolution très préoccupante. Les membres de la société américaine d'épidémiologie (SHEA) en 2009 classaient les BGN-MR comme la principale question d'actualité, avant le SARM et les infections à *Clostridium difficile* [Sinaii, 2010]. A la différence des cocci à Gram positif, aucune nouvelle famille d'antibiotique n'a été mise sur le marché ces 25 dernières années.

L'utilisation massive des antibiotiques à large spectre a été rapidement suivie par le développement de plusieurs résistances bactériennes, notamment celle des entérobactéries aux céphalosporines de 3^{ème} génération. C'est en 1983, en Allemagne que la première souche productrice de BLSE a été signalée [Knothe et al ., 1983]. Depuis, la fréquence de ces souches n'a cessé d'augmenter [bonnet, 2006 ; Paterson & Bonomo, 2005].

Discussion

Le niveau de résistance des entérobactéries est élevé notamment aux céphalosporines de 3^{ème} génération particulièrement chez *K. pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae est un pathogène à fort potentiel épidémiologique, impliqué dans des infections sévères. De nombreuses épidémies nosocomiales dans les unités de réanimations causées par cette bactérie ont été décrites [Carrer et al., 2009].

Dans cette étude, nous rapportons un taux élevé (91,30%) de *K. pneumoniae* de type BLSE, ce taux est légèrement élevé à celui trouvé dans une étude réalisée par Belbel et al à Annaba (80%) [Belbel et al., 2014], un taux moins élevé (26,8%) rapporté à Annaba dans l'hôpital Ibn Rochd [Nedjai et al., 2012]. La fréquence des BLSE chez *K. pneumoniae* reste faible à Alger (19,9%) [Messai et al., 2008], une étude dans le nord ouest algérien a reporté un taux élevé (68,3 %) de *K. pneumoniae* productrice de BLSE [Berrazeg et al., 2013b]

En 2011 une étude comparative de la fréquence de BLSE chez *K. pneumoniae* entre l'Algérie et la France a déclaré que le taux des BLSE produit par *K. pneumoniae* en Algérie (88,6%) est beaucoup plus élevé à celui de France (26,8%) [Berrazeg et al., 2013a], cette forte fréquence de résistance revient à l'utilisation massive des céphalosporine de 3^{ème} génération dans les traitements des maladies causées par *K. pneumoniae* principalement aux unités de soin intensives.

La résistance aux C3G varie de 2,2% au Canada [Jones et al., 2004], 25% dans les hôpitaux de l'Europe du Sud [Babini et al., 2000], 55% dans les hôpitaux de l'Amérique de Sud [Gales et al., 2002] à 76,9% en Egypte [El Kholy et al., 2012].

Les *K. pneumoniae* ont présenté un haut niveau de résistance pour les Aminosides 91,30% pour Tobramycine et 78,26% l'Amikacine, Hassanzadeh et al rapportent la même fréquence de résistance pour l'Amikacine 77,8% en Iran [Hassanzadeh et al., 2009].

Le taux de résistance des *K. pneumoniae* aux Quinolones est de 39,13%, la résistance au Ciprofloxacine s'échelonne de 4,9% au Canada [Zhanel et al., 2010] à 66,6% en Iran [Hassanzadeh et al., 2009]. Belbel et al ont trouvé un taux élevé de résistance aux Quinolones 70% dans le CHU Dorban Annaba durant l'année 2010-2011 [Belbel et al., 2014].

Discussion

Escherichia coli, bactérie responsable de la majorité des infections urinaires communautaires, et infections respiratoires nosocomiales, peu d'études ont été réalisées sur l'*E. coli* isolée des infections respiratoires basses [Fagon et al., 2001].

Dans cette étude, *E. coli* résiste aux C3G (Céfotaxime, Ceftriaxone et Ceftazidime) avec une moyenne de 42,85%, cette résistance est liée à une production de BLSE. Une étude a été réalisée à l'hôpital Mostafa Pacha à Alger en 2005 a rapporté un taux de 7.9% de BLSE chez *E. coli* [Ramdani-Bouguessa et al., 2006], dans la même année Touati et al ont rapporté un taux de 2.4% à Bejaia [Touati., et al 2006].

Selon le réseau de surveillance de la résistance des antibiotiques en Europe 2009 (EARS-Net), l'incidence des *E. coli* productrices de BLSE, varie entre 85 à 100% dans plus de la moitié des pays déclarants, y compris l'Allemagne, la France, la Belgique, le Danemark, la Norvège, la Finlande, l'Irlande, l'Espagne, le Royaume-Uni, l'Italie, le Portugal, la Grèce et l'Autriche. Cependant, les plus faibles proportions ont été signalées par l'Islande (1,8%), en Estonie (2,2%) et la Norvège (2,3%) [EARS-Net., 2009].

La résistance de ces souches aux Aminosides est très basse 28,57% à la Tobramycine, aucune résistance n'a été détectée pour l'Amikacine et la Gentamycine. Le taux retrouvé dans notre étude est bas par rapport à celui rapporté dans d'autres pays en voie de développement la Gentamycine (36,4%), l'Amikacine (27,3%) en Iran en 2009 [Hassanzadeh et al., 2009], en Turquie la résistance aux Gentamycine est 78,9% et 18,4% pour l'Amikacine [Bayram & Balci, 2006].

Enterobacter cloacea est un bacille à Gram négatif fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales, qui se caractérise par sa capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques utilisés en réanimation. *E. cloacea* est une source de morbidité et de mortalité [Kang et al., 2004].

Dans notre étude, 66,66% des souches d'*E. cloacea* sont résistants aux C3G, ce taux est élevé à celui rapporté par une étude récente à Annaba 47,6% [Nedjai et al., 2013], les mêmes auteurs ont rapporté un taux faible (7,2%) de BLSE produit par *Enterobacter spp*

Discussion

[Nedjai et al., 2013]. En 2008 Touati et al ont rapporté une faible fréquence de 17.7% de BLSE produit par *E. cloacea* isolé dans l'est, le centre et l'ouest algérien [Touati et al., 2008].

Dans la littérature, les auteurs rapportent des taux de résistance aux β -lactamines variables mais plus bas que ceux déclarés dans notre étude, ainsi la résistance à la ceftazidime varie de 20% [Hassanzadeh et al., 2009] à 75% [Bayram & Balci, 2006], pour le ceftriaxone de 3,6% [Zhanel et al., 2008] à 68% [Medani et al., 2009].

La résistance aux aminosides est de 66,66% pour la tobramycine, aucune résistance est détectée pour l'amikacine ni la ciprofloxacine, ce taux reste faible à celui rapporté dans la littérature, la résistance est variable de 20% en Iran [Hassanzadeh et al., 2009] à 81% en Turquie [Bayram & Balci, 2006], alors que pour l'amikacine elle est de 40% en Iran [Hassanzadeh et al., 2009] et 59% en Turquie [Bayram & Balci, 2006]. Zhanel et al ont rapporté une résistance à la ciprofloxacine de l'ordre de 3,6% [Zhanel et al., 2008].

Les résultats obtenus des CMI₅₀ montrent une forte baisse de résistance des souches productrices des β -lactamases en ajoutant l'acide clavulanique. Les entérobactéries présentent un taux élevé de résistance à La Ticarcilline et la Céfotaxime: ≥ 4048 $\mu\text{g/ml}$, la résistance baisse en ajoutant l'acide clavulanique : 128 $\mu\text{g/ml}$ pour Ticacilline + acide clavulanique, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ pour Cefotaxime + acide clavulanique, cependant la CMI₅₀ reste moyenne pour la Ceftazidime (128 $\mu\text{g/ml}$), elle diminue en ajoutant l'acide clavulanique à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau N°21). L'association des β -lactamines avec l'acide clavulanique reste un excellent choix thérapeutique contre les souches d'entérobactérie d'un phénotype BLSE.

En générale, l'acquisition des bactéries productrices de BLSE concerne des patients d'un système immunitaire vulnérable, suite à une hospitalisation prolongée et après exposition à des manœuvres invasives tel que les prélèvements protégés distaux. D'autres facteurs de risque sont la malnutrition, l'admission en réanimation, l'antécédent de prise d'antibiotique tel que l'exposition préalable aux C3G (aussi aux fluoroquinolones et aminosides) le nombre d'antibiotiques administrés et la durée du traitement [Ruppé et al., 2010]. Ainsi, le milieu hospitalier joue un rôle de réservoir des souches multi-résistantes dont la dissémination est aggravée par la difficulté d'y appliquer des mesures d'hygiène (port de gants et lavage des mains).

Discussion

L'émergence et la dissémination d'entérobactéries, productrices de carbapénèmases dans différentes régions du monde, représentent une menace importante notamment dans le cadre des infections nosocomiales. Depuis le début des années 2000, les souches d'entérobactéries, productrices de carbapénémase (*Klebsiella pneumoniae*) ont d'abord été décrites dans l'est des États-Unis, puis ont rapidement disséminé dans de nombreuses régions du monde.

Dans notre étude, aucune souche d'entérobactérie n'a présenté une résistance aux carbapénèmes, Robain et al ont rapporté deux souches de *K. pneumoniae*, deux souches d'*E. coli* et une souche de *P. stuartii* résistantes aux carbapénèmes à l'hôpital militaire au centre d'Alger [Robain et al., 2010]. Bayram et al ont signalé en 2006 que 13% de leurs souches d'*E. coli* étaient résistantes à l'imipénème [Bayram & Balci, 2006]. cependant les auteurs ont rapporté une résistance de l'*Enterobacter* aux carbapénèmes avec des taux de 10% et 15% respectivement au Maroc [Madani et al., 2009] et aux philippines [Navoa-Ng et al., 2011].

Le genre *Acinetobacter* est largement répandu dans la nature, ce sont des organismes endogènes dans les différents types de sol et dans l'eau [Peleg et al, 2008]. Au cours des dernières années, *A. baumannii* a été associé à des infections associées aux soins, en particulier chez les patients débilisés. Les principaux sites d'infection sont les voies respiratoires, des voies urinaires, sang, les blessures et les brûlures. Les patients souffrants de brûlures et ceux en unités de soins intensives et / ou utilisant une ventilation mécanique sont plus à risque [Kempf et al, 2012a ; Kusradze et al., 2011].

Une augmentation de la prévalence des souches résistantes a été vue dans le monde entier. A l'échelle Européenne, *A. baumannii* représente le 7^{ème} agent responsable d'infection nosocomiale, causant 10% des pneumopathies [Lahsoune et al., 2007].

A. baumannii est responsable de 7.8 à 23% de mortalité par les pneumonies acquises aux hôpitaux et de 10 à 43% dans les soins intensifs [Kempf et al., 2012a].

En Algérie *A. baumannii* représente 39,9% des infections qui surviennent en réanimation selon le réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques. Ce sont des taux qui restent relativement faibles en les comparant au monde entier [Rahel, 2012].

Discussion

Le traitement des souches multi-résistantes peut être difficile [Drissi et al., 2010]. Les carbapénèmes ont été le médicament de choix contre cet agent pathogène, mais le nombre d'isolats résistants à ces agents antimicrobiens a augmenté considérablement [Ben et al., 2011].

La présente étude visait à définir les bases génétiques de 23 souches d'*A. baumannii* multi-résistantes isolées dans 2 unités de soins intensifs de 2 hôpitaux algériens. Ils ont causé la pneumonie chez les patients débilisés en utilisant une ventilation mécanique.

Toutes les souches étaient résistantes à la plupart des antibiotiques testés principalement à la famille des β -lactamines, dans cette étude, la résistance des *A. baumannii* aux C3G est alarmante 100% de nos souches sont résistantes au ceftazédime et aussi aux inhibiteurs des β -lactamines 91,30% (ticarcilline+acide clavulanique et piperacilline + tazobactam), les taux rapportés dans les études sont variable, allant de 22% en Iran [Hassanzadeh et al., 2009] à 100% en Turquie [Bayrem & Balci, 2006]. Cette résistance est liée à une hyperproduction d'une céphalosporinase.

Nos souches d'*A. baumannii* présentent une forte prévalence de résistance à l'imipénème (91,30%), il n'y a que peu de données sur la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* du Nord d'Afrique, notamment en Algérie, le pourcentage des souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipénème diffère selon les pays, allant de 5,2% en Algérie à 28,8% en Tunisie [Amazian et al., 2006].

La majorité des isolats présentait une résistance à d'autres antibiotiques tels que les aminosides 47,51% et les quinolones 86,95% (Tableau N°20), comme il a été signalé ailleurs [Carvalho et al., 2009]. Aucune souche n'est résistante à la colistine. En dépit de sa toxicité rénale, la colistine est devenu l'antibiotique le plus utile pour traiter les infections causées par des pathogènes résistants aux carbapénèmes [Lolans et al, 2006; Nordmann & Poirel, 2002], mais la diffusion d'*A. baumannii* résistant à la colistine est préoccupante [Lopez-Rojas et al., 2011]. D'autre part, de nombreuses études fournissent l'activité de la tigécycline (non disponible en Algérie) sur les isolats cliniques d'*A. baumannii* multi-résistants [Kempf et al, 2012a; Betriu et al, 2002]. Toutes nos souches étaient sensibles à ce nouvel antibiotique.

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* causant les pneumonies nosocomiales surviennent essentiellement en réanimation et plus particulièrement chez les patients sous ventilation mécanique [Reechaipichitkul et al., 2013]

Discussion

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 contrairement à notre étude aucune souche de *P. aeruginosa* a présenté une résistance aux carbapénèmes. Selon l'AARN ce groupe présente le taux le plus résistant des groupes des β -lactamines suivie par le groupe de pénème avec 16%. Le groupe céphèmes est de 15,2%, et pour les monobactames 16,9%. Concernant les aminosides et quinolone, l'AARN, montre une résistance des souches, respectivement de 5,3 et 15% [Rahal, 2012]

Nos souches isolées se caractérisent par une forte sensibilité aux principales familles d'antibiotique contrastant avec une multi-résistance des autres BGN isolés au cours de notre étude notamment *A. baumannii* et les entérobactéries.

De même, toutes les études ont rapporté des résistances aux autres antibiotiques à des taux variables, nous citons les taux des principaux antibiotiques utilisés en réanimation : la ceftazidime de 4% [Oudhuis et al., 2008], 28,67% (notre étude) à 78% [Hassanzadeh et al., 2009], la ciprofloxacine de 11% [Oudhuis et al., 2008] à 72% [Salomao et al., 2008], 23,80 (notre étude) et à la gentamycine 18% [Jean et al., 2009] à 70 % [Hassanzadeh et al., 2009], 23,80% (notre étude).

Indicateur du tableau de bord des infections nosocomiales en France, le *Staphylococcus aureus* est considéré comme une bactérie indicatrice référentielle de la résistance aux antibiotiques.

Dans notre étude, 37,5% des *S. aureus* sont résistants à l'oxacilline, ce taux est faible à celui rapportés dans la littérature, Alioua et al ont rapporté un taux très faible 0,8% de *S. aureus* SARM+ dans les pneumonies à Annaba et 80% dans les infections acquise dans les soins intensifs [Alioua et al., 2014], cependant le taux de notre étude reste faible à celui rapporté par le réseau algérien de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans son 13^{ème} rapport avec 58% de *S. aureus* résistant à la méthiciline (SARM) dans les services de réanimation dans le monde. cette résistance varie d'un pays à un autre, 21% en Allemagne [Jones et al., 2004] à 95% au Brésil [Salomao et al., 2008].

Discussion

Il est à noter que contrairement au BGN la résistance à la methicilline chez les *S. aureus* est élevée dans les pays en voie de développement et développés, comme les USA et la France avec 58% et 40% de *S.aureus* SARM+ respectivement [Jones et al., 2004].

Le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux β -lactamines est la production enzymatique des β -lactamases.

Entre 1984 et 1988, des enzymes de type TEM ont été rapportées chez des souches *Klebsiella spp*, d'*E .coli* [Ben Hassen et al., 1990] à partir des années 1990 des associations d'enzyme de TEM et SHV ont été observés depuis, la fréquence des entérobactéries résistantes au C3G a augmenté d'une façon considérable mondialement.

Le haut niveau de résistance aux antibiotiques exprimés par nos souches s'exprime par la production de différents enzymes- β -lactamases.

Ce n'est qu'au début des années 2000 que les BLSE de type CTX-M ont été identifiées chez *E .coli*, actuellement sont les plus fréquentes. La dissémination de ces enzymes et en particulier du variant CTX-M15 concerne l'ensemble des entérobactéries.

Une augmentation dramatique de la prévalence de portage communautaire des souches productrices de CTX-M a été clairement démontrée [Canton & Coque, 2006]. Ainsi plusieurs auteurs penseraient que les enzymes de type CTX-M seraient introduites dans le milieu hospitalier à partir du milieu communautaire [Ben-Ami et al., 2006], la cause de cette explosion des gènes CTX-M dans la population n'est pas bien connue, elle résulterait de la dissémination de plusieurs clones et/ou éléments génétiques mobiles portant les gènes *bla*_{CTX-M}, de plus l'émergence simultanée dans différents pays d'une diversité d'enzyme ont suscité de nouvelles hypothèses comme la transmission de gène *bla*_{CTX-M} à partir d'animaux domestiques et de nourriture d'origine animale [Rodriguez-Villalobos et al., 2006].

En Algérie, il apparaît clairement que les CTX-M ont diffusé, plusieurs études rapportent non seulement la diffusion de CTX-M-15, mais également de CTX-M3 et CTX-M28 [Ahmed et al., 2012 ; Nedjai et al., 2012 ; Labadene et al., 2008 ; Meradi et al., 2011 ; Messai et al., 2006, 2008 ; Naas et al., 2011 ; Touati et al., 2006, 2007 ; Bebel et al., 2014].

Dans notre étude, (20/23) 86,95% des *K. pneumoniae* sont porteuses du gène *bla*_{CTX-M-15}, cette fréquence est légèrement basse à celle rapportée par une étude à Annaba 95%

Discussion

[Bebel et al., 2014]. 38% (9/23 *K. pneumoniae*, 1/3 *E. cloacae*) des entérobactéries hébergent le gène de *bla*_{SHV-12} et 23,80% (14/23 *K. pneumoniae*, 2/7 *E. coli*) hébergent le gène *bla*_{SHV-11}, deux souches de *K. pneumoniae* portent le gène *bla*_{TEM-1} comme a été déjà décrit [Nedjai et al., 2012 ; Bebel et al., 2014].

Les BLSE de type CTX-M en particulier de type CTX-M15 sont mondialement décrites en Europe [Miftod et al., 2012; Carrer et al., 2009; Damjanova et al., 2006; Lytsy et al., 2008; Canton et al., 2008] en Afrique [Lonchel et al., 2013 ; Iroha et al., 2012 ; Mamlouk et al., 2006], en Asie et Amérique [Kim et al., 2013 ; Park et al., 2012 ; Xia et al., 2009].

Dans notre étude, l'antibiogramme a montré une sensibilité de toutes les entérobactéries aux carbapénèmes testés. Ces antibiotiques constituent le traitement de choix pour les IRB, néanmoins leur utilisation abusive n'est pas sans conséquence l'isolement des souches d'entérobactéries produisant une carbapénémase est croissant dans le monde entier [Potron et al., 2011a]. Il s'agit essentiellement des bêta-lactamases de type KPC, des méthallo-bêta-lactamases IMP/VIM et plus récemment de méthallo-bêta-lactame NDM-1 et OXA-48. *K. pneumoniae* reste l'espèce d'entérobactérie chez qui la plus part de ces carbapénémases ont été identifiées [Ben et al., 2013; Zhou et al., 2013; Brink et al., 2012; Bush, 2010; Potron et al., 2011c].

En Algérie, Robin F et al ont rapporté pour la première fois la résistance par métallo-enzyme de type VIM-19 chez des souches d'entérobactérie [Robin et al., 2010], nous apportons aussi qu'au niveau de notre laboratoire une souche de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes a été isolée pour la première fois en 2013, le mécanisme de résistance semble une KPC, d'autre part dans notre laboratoire et dans la même année 3 souches d'*E. coli* productrices de NDM-5 (détectées pour la première fois en Afrique et deuxième mondialement) a été signalées (Données non publiées).

Le risque d'impasse thérapeutique est réel, ce d'autant qu'il n'existe pas de perspectives proches de mise sur le marché de nouveau antibiotique anti-Gram-négatifs et que de nouvelles carbapénémases ont une activité hydrolytique encore plus étendue vis-à-vis des carbapénèmes.

Discussion

La résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* est associée à une variété de mécanismes combinés. Le mécanisme principal est la production de β -lactamases hydrolysant les carbapénèmes. Ces groupes spécifiques de β -lactamases sont classés en catégorie B métallob-lactamases (MBL) et le plus souvent la classe D (oxacillinasés) [Kempf et al., 2012a]. D'autres mécanismes comprennent pompe à efflux, la perte ou l'expression de 29 kDa (Caro), 33-39 kDa et 43kDa (homologue à la protéine de résistance à imipénème de *Pseudomonas aeruginosa*, OPRD), protéines de faible niveau et une affinité altérée dans les protéines liant la pénicilline (PLP) [Ben et al, 2011; Peleg et al, 2008].

Le gène *bla*_{OXA-51} a été trouvé dans tous les isolats d'*A. baumannii* testés. *bla*_{OXA-51} est considéré comme une composante naturelle du chromosome de l'espèce [Corbella et al., 2000]. Dans la littérature, la présence de ce gène a été utilisée pour identifier *A. baumannii*. Ce gène peut être associé à une résistance aux carbapénèmes dans le cas des séquences d'insertion de type ISAbal, qui transportent des promoteurs forts, se trouvent en amont de gène *bla*_{OXA}, entraînant une augmentation de l'expression et de la résistance concomitante aux carbapénèmes [He'ritier et al., 2006].

7 souches résistantes à l'imipénème, seulement *bla*_{OXA-51} a été détecté (Tableau N° 24). La résistance peut s'expliquer par des mécanismes non enzymatiques [Peleg et al., 2008], ou l'insertion de séquences ISAbal [Kusradze et al.,2011 He'ritier et al., 2006].

Certaines études ont montré que la présence de ISAbal en amont de *bla*_{AmpC} a été corrélée avec la résistance au céfépime [Lin et al., 2011]. Tous nos isolats étaient aussi résistants au céfépime, mais cette séquence d'insertion n'a pas été cherchée parmi nos souches.

La première enzyme OXA identifiée avec une activité hydrolysant les carbapénèmes était d'une souche clinique d'*A. baumannii* isolée en 1985 d'Edimbourg, en Ecosse. Le plasmide codant pour ce facteur de résistance, initialement nommé ARI-1, a été trouvé pour être transférables, et le gène a ensuite été séquencé et nommé *bla*_{OXA-23} [Donal et al ., 2000].

A noter, l'origine de *bla*_{OXA-23} a récemment été identifié comme le chromosome d'*Acinetobacter radioresistens*, une espèce commensale de la peau humaine [Poirel et al., 2008a,b]. Ce type d'enzyme contribue maintenant à la résistance des *A. baumannii* aux carbapénèmes dans le monde, provoquant des flambées nosocomiales ou infections sporadiques [Ben et al., 2011; Kempf et al , 2012a]. Au meilleur de notre connaissance, la

Discussion

première souche clinique d'*A. baumannii* porteuse du gène *bla*_{OXA-23} identifiée en Algérie était en 2004 [Mugnier et al., 2010]. Dans la présente étude, *bla*_{OXA-23} a été détecté dans 14 de nos souches. Cependant, Une souche contenant à la fois *bla*_{OXA-24} et *bla*_{OXA-23}, une autre souche contenant à la fois *bla*_{OXA-58} et *bla*_{OXA-23}.

Les enzymes OXA-24-like ont été trouvés en Espagne, la Belgique, le Portugal, la République tchèque, la Géorgie, la France et les Etats-Unis et en Algérie [Bakour et al., 2013] et l'enzyme OXA-58-like ont été identifiée dans le monde entier [Kempf et al., 2012a], y compris l'Algérie [Drissi et al., 2010; Touati et al., 2012], la Tunisie [Poirel et al., 2006, 2008a, b] et plus récemment en Turquie [Metan et al., 2013].

Habituellement, les enzymes de type OXA présentent une faible hydrolyse des carbapénèmes et peuvent ne pas toujours montrer le profil de résistance, mais quand ils sont associés à des éléments d'insertion, ils peuvent avoir une augmentation de leur expression et de montrer une résistance aux carbapénèmes [He'ritier et al., 2006].

Autre β -lactamases ont été rapportés chez *A. baumannii*. Il s'agit notamment de β -lactamases de type TEM-1, SHV, CTX-M, PER-1 et VEB-1 [Peleg et al., 2008]. Même si elles sont importantes, il est difficile d'évaluer leur impact sur la résistance en présence de l'AmpC céphalosporinases [Corvec et al., 2003]. Trois de nos souches possèdent *bla*_{TEM-1}. Cependant, *bla*_{PER}, *bla*_{SHV} et *bla*_{CTX-M} n'ont pas été détectés parmi nos isolats. Une étude récente a rapporté que la prévalence du gènes *bla*_{TEM-1} analysé par PCR multiplex [Woodford et al., 2006] chez *A. baumannii* isolé à Kaohsiung dans un hôpital militaire (Kaohsiung, Taiwan) était 79.40% [Ben et al., 2011]. La même étude a montré que dans *A. baumannii* la présence de *bla*_{TEM-1} prévoit que la résistance à la ceftazidime. Souche N° 1, abritant seulement *bla*_{TEM-1} était résistante à tous les β -lactamines sauf carbapénèmes (tableau N°24).

Le New Delhi métallo-bêta-lactamase (NDM-1) est un nouveau type de MBL [Rolain et al., 2010] tout d'abord identifié à partir des souches de *K. pneumoniae* et isolats d'*E. coli* provenant d'un patient hospitalisé en Inde auparavant [Yong et al., 2009] a récemment émergé dans les isolats d'*A. baumannii*. Ce gène se répand dans les bactéries par transfert horizontal transformation ou conjugaison ce qui le rend capable de passer de la cellule à l'autre rapidement [Rolain et al., 2010]. NDM-1 ont été signalés dans le monde sauf au Sud et au centre d'Amérique [Nordmann et al., 2011], il a été récemment rapporté en Afrique [Lowman et al., 2011; Brink et al., 2012; Poirel et al 2011] et en Afrique du Nord: Libye [Hammerum et al., 2012], la Tunisie [Ben et al., 2013], le Maroc [Poirel et al 2011].

Discussion

De nombreux rapports sur l'émergence de *bla*_{NDM-1} chez les *A. baumannii* ont été décrits à travers le monde [Rolain et al., 2010], dont l'Algérie [Boulanger et al., 2012; Bonnin et al., 2012; Hussenet et al., 2011; Mesli et al., 2013].

Ce nouveau métallo-bêta-lactamase produit par des souches cliniques d'*A. baumannii* a également été détecté en Algérie d'abord décrit par Mesli et al, dans le nord-ouest de l'Algérie [Mesli et al., 2013; Boulanger et al., 2012] à Alger, Sétif, Constantine, Tlemcen comme indiqué précédemment [Bonnin et al., 2012; Hussenet et al., 2011]. Dans notre étude, une seule souche contenant *bla*_{NDM-1} a été détectée dans les prélèvements protégés distaux chez un adulte. Dans notre laboratoire 7 souches d'*A. baumannii* porteuse de NDM-1 dans les prélèvements d'urine ont été rapportés (donnée non publiée).

Au niveau de notre laboratoire, 14 souches de *P. aeruginosa* isolées à partir des prélèvements issus des services de réanimation porteuses du gène VIM-2 métallo-β-lactamases, de la classe B selon la classification d'Ambler [Touati et al., 2013].

L'étude de diversité clonale par PFGE, des 19 souches d'entérobactéries productrices de BLSE a montré huit différents profils de A à H. Le génotype A était le pulsotype le plus commun (7/17), suivie par le pulsotype B (4/17). Toutes les souches de pulsotype A et B étaient des *K. pneumoniae* porteuses du gène CTX-M15. Ce qui montre la dissémination des CTX-M15 dans le service de réanimation. Cette dissémination est liée à la possibilité de transfert horizontale de ces gènes et à la capacité des *K. pneumoniae* d'acquérir de nouveau gène.

Les souches d'*A. baumannii* isolées à l'hôpital Ibn Sina a montré la diffusion du génotype A qui a été le pulsotype le plus commun (10/16), suivie par le pulsotype B (4/16). Toutefois, les différents profils électrophorétiques ont été trouvés dans Ibn Hôpital Roched. Ces données peuvent être liées aux caractéristiques de diffusion de ce microorganisme, son permanence pendant de longues périodes dans les hôpitaux, la principale forme de la diffusion est le contact humain et la mobilité des patients et le personnel [Mugnier et al, 2010; Lin et al, 2011].

L'identification des *bla*_{OXA-23} dans cette étude confirme la large répartition géographique de carbapénémase chez *A. baumannii* ainsi que leur apparence parallèle dans des souches d'épidémie. En outre, il est important de suivre politiques de restriction des antibiotiques pour éviter l'usage excessif de carbapénèmes et d'autres antibiotiques à large spectre dans notre

Discussion

pays. En outre, il est d'une grande importance pour étudier la locale épidémiologie d'*A. baumannii* isolé pour établir le meilleur traitement et utiliser le bon contrôle épidémiologique.

Au cours de cette thèse, nous avons pu par ailleurs participer à la réalisation des études d'épidémiologie moléculaire afin d'investiguer les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques à partir de différentes collections d'isolats cliniques de bactéries multi-résistantes. L'ensemble de ces travaux se sont portés principalement sur l'espèce *A. baumannii*, et les entérobactéries principalement *K. pneumoniae*. Les deux étant des bactéries émergentes qui sont fréquemment résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques. Ceci s'explique sans doute, comme il a bien été décrit dans la littérature, par la grande plasticité de leurs génomes, par leur capacité à échanger et à acquérir du matériel génétique exogène, mais aussi par leur capacité à évoluer dans des niches écologiques très variées.

Conclusion

Au terme de ce travail, nous avons confirmé que la résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation mondiale et constitue un problème majeur de santé publique. En effet, depuis ces dernières années, nous avons assisté à une augmentation fulgurante de la résistance aux antibiotiques, en particulier chez les bactéries à Gram négatif.

Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) sont les infections nosocomiales (IN) les plus fréquentes parmi les infections surveillées en réanimation elles représentent 67% des IN avec densité d'incidence de 33,06/1000 jours de ventilation invasive, elles sont liées à la ventilation mécanique dans tous les cas.

Les BGN sont les germes les plus dominants dans les infections respiratoires basses avec entérobactéries (48,27%), *A. baumannii* (26,43%) et *P. aeruginosae* (25,28%).

La résistance aux antibiotiques des BGN isolées est très inquiétante, des bactéries résistantes aux C3G avec un pourcentage élevé de production de BLSE 86.95 % (20/23) des *K. pneumoniae*, 86,95% des *Acinetobacter baumannii* résistent aux carbapénèmes.

Dans notre étude l'utilisation des outils de biologie moléculaire et des logiciels de bioinformatique nous a permis la caractérisation des gènes de résistance des BGN aux antibiotiques et la dissémination de BLSE de type CTX-M-15 et HSV chez les entérobactéries et OXA-23 chez les souches d'*A. baumannii* résistants aux carbapénèmes.

La prise en charge du problème des bactéries à Gram négatif productrice de BLSE est un véritable défi du fait de l'augmentation de la diversité et de l'ubiquité des gènes codant ces enzymes chez les BGN. Le risque accru d'échec thérapeutique lié aux IRB peut conduire à une escalade thérapeutique sans issue. Les microbiologistes sont confrontés à l'émergence continue de nouvelles enzymes et à l'association de différentes enzymes et mécanisme de résistance dans le même organisme. Cette complexité rend leur détection plus difficile.

Face à cette situation inquiétante, représentée par l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, la problématique essentielle reste de trouver les solutions à proposer pour lutter

Conclusion

contre la diffusion de la résistance aux antibiotiques. A ce jour, peu d'antibiotiques restent actifs contre les infections causées par des bactéries à Gram négatif multi-résistantes (BMR), on peut citer comme exemple les carbapénèmes, la colistine et la polymyxine B. De ce fait, la lutte contre ces bactéries peut se faire par la prévention qui consiste entre autre, à comprendre leurs mécanismes de transmission, à trouver les déterminants de la résistance, et par la suite développer et mettre en place des outils de détection et de surveillance en temps réel.

Ainsi, il est souhaitable de dépister le portage et d'établir la surveillance des IRB par les BGN producteurs de BLSE et essentiellement les carbapénémases. Les modifications et restriction des schémas thérapeutiques permettent uniquement de gagner du temps, compte tenu de la complexité du problème.

La résistance aux carbapénèmes chez les BGN fait partie des résistances émergentes aux antibiotiques d'importance clinique. L'enjeu dans notre situation est important car la détection des souches résistantes aux carbapénèmes est difficile avec les méthodes utilisées en routine au laboratoire, et l'identification de ces souches est primordiale pour pouvoir contenir leur émergence et diffusion en milieu hospitalier et en réanimation plus particulièrement

Références bibliographiques

- Abbassi MS, Torres C, Achour W, Vinue´ L, Sa´enz Y, Costa D, Bouchami O, Ben Hassen A (2008). Genetic characterization of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 32: 308–314.
- Ahamed J, Kundu M (1999). Molecular characterization of the SHV-11 beta-lactamase of *Shigella dysenteriae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43:2081-3.
- Ahmed ZB, Ayad A, Mesli E, Messai Y, Bakour R, Drissi M (2012). CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *East. Mediterr. Health. J.* 18:382-6.
- Alioua MA, Labid A, Amoura K, Bertine M, Gacemi-Kirane D, Dekhil M (2014). Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Med. Mal. Infect.* In press.
- Allaouchiche B, Geissler A. Infections bactériennes nosocomiales en réanimation : le point de vue des cliniciens. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. *Précis de bactériologie clinique.* 2000, Edition ESKA ; 449-45
- Amazian K, Fendri C, Missoum MF, Bouzouaia N, Rahal K, Savey A, Saadatian-Elahi M, Fabry J (2006). Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25 : 340-3.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289(1036):321–31
- Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Decré D, Genel N, Boucherit-Otmani Z, Arlet G, Drissi M (2013). Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb. Drug. Resist.* 19:185-90.
- Babini GS, Livemore DM (2000). Antimicrobiol resistance amongst *Klebsiella* spp collected from intensive care units in southern and western Europe in 1997–1998. *J. Antimicrob Chemother.* 45:183–9.
- Bakour S, Touati A, Sahli F, Ameer AA, Haouchine D, Rolain JM (2013). Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. *Diagn.Microbiol.Infect.D.* 76:529-31.
- Bakour SM, Kempf A, Touati A, Ait A, Haouchine D, Sahli F, Rolain JM (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J.Med.Microbiol.* 61:1341-1343.

Références bibliographiques

- Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Reguig A, Jamali L, Zerouali K, Timinouni M (2013) Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated β -lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 66:11-6.
- Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 18:294–298.
- Belbel Z, Chettibi H, Dekhil M, Ladjama A, Nedjai S, Rolain JM (2014). Outbreak of an armA Methyltransferase Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital. *Microb. Drug. Resist.*
- Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, Leavitt A, Carmeli Y (2006). Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin. Infect. Dis.*42:925-34.
- Ben Hassen A, Fournier G, Kechrid A, Fendri C, Ben Redjeb S, Philippon A (1990). Enzymatic resistance to cefotaxime in 56 strains of *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. at a Tunisian hospital (1984-1988)]. *Pathol. Biol. (Paris)*. 38:464-9.
- Ben NA, Decre D, Compain F, Genel N, Barguillil F, Arlet G (2013). Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:4089-90
- Ben RJ, Yang MC, Hsueh JC, Shiang JC, Chien ST (2011). Molecular characterisation of multiple drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in southern Taiwan. *In. J. Antimicrob. Agents*. 38 : 403-408.
- Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R (1992). A novel extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamase not derived from TEM- or SHV-class enzymes. *J. Antimicrob. Chemother.* 29:590–592
- Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, Rolain JM (2013 a). Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS. One*. 8:e61428.
- Berrazeg M, Drissi M, Medjahed L, Rolain JM (2013 b). Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic-resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *J. Med. Microbiol.* 62: 864-74.
- Betriu C, Rodríguez-Avial I, Sánchez BA, Gómez M, Álvarez J, Picazo JJ (2002). In Vitro Activities of Tigecycline (GAR-936) against Recently Isolated Clinical Bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46 : 892-895.
- Bonnet R. β -Lactamines et entérobactérie .In Courvalin P, Leclercq R ,Bingen E. *Antibiogramme* .2006 ,Edition ESKA ;141-177

Références bibliographiques

- Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, Nordmann P (2012). Dissemination of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin.Microbiol.Infect.* 18:362-365.
- Bouallègue-Godet O, Ben Salem Y, Fabre L, Demartin M, Grimont PA, Mzoughi R, Weill FX (2005). Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Livingstone producing CTX-M-27 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. *J. Clin. Microbiol.* 43:1037-44.
- Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P (2012). NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob.Agents Chemother.* 56:2214-2215.
- Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR (2004). Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48:3758-64.
- Bradford PA (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*14:933-51.
- Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J (2005). Rapid spread of carbapenem- resistant *Klebsiella pneumoniae* in NewYork city:a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch. Intern. Med.* 165 : 1430-5.
- Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Rossolini GM, Amicosante G, Toniolo A (2005). Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25:157-62.
- Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Sithole S, Richards GA, Poirel L, Nordmann P (2012). Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J.Clin.Microbiol.* 50:525-527.
- Bush K. (2010) Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr. Opin. Microbiol.* 13:558-64.
- Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, Jacoby GA, Kishony R, Kreiswirth BN, Kutter E, Lerner SA, Levy S, Lewis K, Lomovskaya O, Miller JH, Mobashery S, Piddock LJ, Projan S, Thomas CM, Tomasz A, Tulkens PM, Walsh TR, Watson JD, Witkowski J, Witte W, Wright G, Yeh P, Zgurskaya HI (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 894-6.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995). A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39:1211–33.
- Canton R, Coque TM (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9 :466-75.

Références bibliographiques

- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:144-153
- Carrër A, Lassel L, Fortineau N, Mansouri M, Anguel N, Richard C, Nordmann P (2009). Outbreak of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit of a French hospital. *Microb. Drug. Resist.* 15:47-54.
- Carvalho KR, D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Peirano G, Galvão dos Santos LC, Felix Pereira MJ, Asensi MD (2009). Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. In. *J. Antimicrob. Agents.* 34 : 25-28.
- Chastre J, Fagon JY(2002). Ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 165: 867-903.
- Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J (2000). Emergence and Rapid Spread of Carbapenem Resistance during a Large and Sustained Hospital Outbreak of Multiresistant *Acinetobacter baumannii* . *J. Clin. Microbiol.* 38 : 4086–4095.
- Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A (2003). AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains . *J. Antimicrob. Chemother.* 52 : 629–635.
- Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Bauernfeind A, Füzi M (2006). Nation wide spread of clonally related CTX-M-15-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:275-8.
- Davin-Régli A, Bonnet C. *Enterobacter* . In Freney J, Renaud F, Leclercq R , Riegel P. *Précis de bactériologie* .2007 , Edition ESKA ; 1016-1023.
- Denis F, Poly MC, Martin C, Bingen E, Quentin R. In *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. 2007 ; Edition MASSON ;295.
- Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM (2011). Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 37:544-6.
- Diene SM, Merhej V, Henry M, El Filali A, Roux V, Robert C, Azza S, Gavory F, Barbe V, La Scola B, Raoult D, Rolain JM (2013). The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Mol. Biol. Evol.* 30: 369-383
- Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL (1996). Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 1519-25.

Références bibliographiques

- Dogru A, Sargin F, Celik M, Sagiroglu AE, Goksel MM, Sayhan H (2010). The rate of device-associated nosocomial infections in a medical surgical intensive care unit of a training and research hospital in Turkey: one-year outcomes. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63:95-8.
- Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK (2000). Sequence Analysis of ARI-1, a Novel OXA β -Lactamase, Responsible for Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44 : 196-199
- Drancourt M. *Klebsiella pneumoniae*. In Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de bactériologie clinique. 2007, Edition ESKA ;1111-1114.
- Drissi M, Poirel L, Mugnier PD, Ahmed ZB, Nordmann P (2010). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29 : 1457-1458.
- Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, Barnaud G, Delisle F, Rossier A, Lambert T, Philippon A, Arlet G (2004). Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48:1249-55.
- EL-Kholy A, Saied T, Gaber M, Younan MA, Haleim MM, El-Sayed H, El-Karaksy H, Bazara'a H, Talaat M (2012). Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units at Cairo University hospitals: first step toward initiating surveillance programs in a resource-limited country. *Am. J. Infect. Control.* 40:e216-20.
- Fagon JY, Chastre J, Allan AJ, Montravers P, Novara A, Gibert C (1993). Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am. J. Med.* 94 : 281-288
- Fagon JY, Ract C, Novara A (2001). Prévention des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. *Réanimation.* 10 : 61-7
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE(2009). Extended-spectrum beta-lactamase producing organisms. *J. Hosp. Infect.*73:345–54.
- Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA (2006). The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 55:1619-29.
- Fangio P, Rouquette-Vincenti I, Rousseau JM, Soullié B, Brinquin L (2002). Comparaison entre le prélèvement distal protégé et l'aspiration endotrachéale : *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* 21 : 184-92
- Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M (2008). Antimicrobial Susceptibility Patterns And Distribution Of *bla_{OXA}* Genes Among *Acinetobacter Spp.* Isolated From Patients At Tehran Hospitals. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61: 274-278
- Freney J, Croze M. Entérobactériaceae-généralités. In Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P .Précis de bactériologie clinique. 2007, Edition ESKA ; 979-798.

Références bibliographiques

- Gales AC, Sader HS, Jones RN (2002). SENTRY Participant Group (Latin America). Urinary tract infection trends in latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44:289–99.
- Gassama A, Boye CS, Ndir I, Kairé O, Coly I, Sow AI, Macondo E, Diop-Diop M, Mboup S(1999). Microméthodes d'identification des Entérobactéries. *Dakar. Médical.* 44: 69-75.
- Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, Papafraggas E, Malamou-Lada H, Tzouvelekis LS, Legakis NJ, Vatopoulos AC (2003). VIM-1 metallo--lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 41:3893–6.
- Gionco B, Pelayo JS , Venancio EJ, Cayô R, Gales AC , Carrara-Marroni FE (2012). Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. *J. Antimicrob. Chemother.* 10: 2531-2532.
- Hall RM, Collis CM (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug. Resist. Updat.*1:109-19.
- Hammerum, A. M., A. R. Larsen, F. Hansen, U. S. Justesen, A. Friis-Moller, L. E. Lemming, K. Fuursted, P. Littauer, K. Schonning, B. Gahrn-Hansen, S. Ellermann-Eriksen, B. Kristensen, A. M. Hammerum, A. R. Larsen, F. Hansen, U. S. Justesen, A. Friis-Moller, L. E. Lemming, K. Fuursted, P. Littauer, K. Schonning, B. Gahrn-Hansen, S. Ellermann-Eriksen, and B. Kristensen (2012). Patients transferred from Libya to Denmark carried OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int.J.Antimicrob.Agents.* 40:191-192.
- Hassanzadeh P, Motamedifar M , Hadi N (2009). Prevalent bacterial infections in intensive care units of Shiraz University of medical sciences teaching hospitals, Shiraz, Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62:249-53.
- Hays C, Benouda A, Poirel L, Elouennass M, Nordmann P (2012). Nosocomial occurrence of OXA-48 producing enterobacterial isolates in a Moroccan hospital. *Maroc. Int. J. Antimicrob. Agents.* 39:545-7.
- Hedge PJ, Spratt BG (1985). Resistance to beta-lactam antibiotics by re-modelling the active site of an *E. coli* penicillin-binding protein. *Nature.* 318:478-80.
- He ´ritier C, Poirel L, Nordman P (2006). Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12 : 23-13.
- Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H (2010). Global spread of carbapenemresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 : 233–8.

Références bibliographiques

- Huang ZM, Mao PH, Chen Y, Wu L, Wu J (2004). Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua. Liu. Xing. Bing. Xue. Za. Zhi.* 25:425–427
- Humphreys H, Newcombe RG, Enstone J, Smyth ET, McIlvenny G, Davies E, Spencer R (2010). Hospital Infection Society Steering Group. Four country healthcare-associated infection prevalence survey: pneumonia and lower respiratory tract infections. *J. Hosp. Infect.* 74 :266-70
- Husenet C, Jaureguiberry S, Robert J, Rouby JJ, Bricaire F, Caumes E (2011). 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.* 18:358-360.
- Hassanzadeh P, Motamedifar M, Hadi N (2009). Prevalent bacterial infections in intensive care units of Shiraz University of medical sciences teaching hospitals, Shiraz, Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62:249-53.
- Iroha IR, Esimone CO, Neumann S, Marlinghaus L, Korte M, Szabados F, Gatermann S, Kaase M (2012). First description of *Escherichia coli* producing CTX-M-15- extended spectrum beta lactamase (ESBL) in out-patients from south eastern Nigeria. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 23;11:19.
- Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, and Matsuzawa H (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39:2269–2275.
- Jean SS, Hsueh PR, Lee WS, Chang HT, Chou MY, Chen IS, Wang JH, Lin CF, Shyr JM, Ko WC, Wu JJ, Liu YC, Huang WK, Teng LJ, Liu CY (2009). Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among non-fermentative Gram-negative bacteria in Intensive Care Units in Taiwan: SMART programme data 2005. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33:266-71.
- Jone ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP (2004). Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit--a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 3:14.
- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Oh M, Kim EC, Choe KW. (2004). Bloodstream infections caused by *Enterobacter* species: predictors of 30-day mortality rate and impact of broad-spectrum cephalosporin resistance on outcome. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 812–818.
- Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE, Livermore DM, Woodford N (2006). Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:665-8..
- Kassis-Chikhani N, Vimont S, Asselat K, Trivalle C, Minassian B, Sengelin C, Gautier V, Mathieu D, Dussaix E, Arlet G (2004). CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in long-term care facilities, France. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1697-8.

Références bibliographiques

- Kelly JA, Dideberg O, Charlier P, Wery JP, Libert M, Moews PC, Knox JR, Duez C, Fraipont C, Joris B (1986). On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science*. 231:1429-31.
- Kempf M, Rolain JM (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *In. J. Antimicrob. Agent*. 10 : 105-114.
- Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Touati A, Rolain JM (2012). Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS. One*. 7:e31676.
- Kermas R, Touati A, Brasme L, Le Magrex-Debar E, Mehrane S, Weill FX, De Champs C (2012). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serotype Brunei and Heidelberg at the Hussein Dey hospital in Algiers (Algeria). *Foodborne. Pathog. Dis*. 9:803-8.
- Kim MN, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee K, Chong Y (2012). Nosocomial Clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 2340 in Four Patients at a Korean Tertiary Care Hospital. *J. Clin. Microbiol*. 10 : 06855-11
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 11, 315–317.
- Koh TH, Babini GS, Woodford N, Sng LH, Hall LM, Livermore DM (1999). Carbapenem-hydrolysing IMP-1-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet*. 353:2162
- Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, Bouaziz M, Hammami A (2006). Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50 : 4198-4201.
- Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM (2011). Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *In. J. Antimicrob. Agent*. 38 : 164-168.
- Labdene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R (2008). Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother*. 62:133–6.
- Laffineur K, Janssens M, Charlier J, Avesani V, Wauters G, Delmée M (2002). Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting gram-negative rods. *J. Clin. Microbiol*. 40:1085-7.
- Lahsoune M, Boutayeb H, Zerouali K, Belabbes H, El Mdaghri N (2007). Prevalence and in vitro antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter baumannii* strains in a Moroccan university hospital. *Med. Mal. Infect*. 37:828-31

Références bibliographiques

- Lartigue MF, Fortineau N, Nordmann P(2005). Spread of novel expanded-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in a university hospital in the Paris area, France. Clin. Microbiol. Infect. 11:588-91.
- Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akpabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, Bercion R, Gautier V, Arlet G (2006). Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. Antimicrob. Agents. Chemother. 50:2433-8.
- Lee YH, Cho B, Bae IK, Chang CL, Jeong SH (2006). *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 beta-lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 beta-lactamase gene. J. Antimicrob. Chemother. 57:1259-61.
- Li M, Pan P, Hu C (2013). Pathogen distribution and antibiotic resistance for hospital acquired pneumonia in respiratory medicine intensive care unit. J. Cent. South. Univ. (Med Sci), 38: 1672-7347.
- Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM (2005). First isolation of metallo--lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. J. Clin. Microbiol. 43:516–9.
- Lin MF, Kuo HY, Yeh HW, Yang CM, Sung CH, Tu CC, Huang ML, Liou LM (2011). Emergence and dissemination of *bla*_{OXA-23}-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* sp in a regional hospital in Taiwan. J. Microbiol. Immunolo. Infect. 44 : 39-44.
- Livrelli V, Boonet R, Joly B, Darfeuille-Michaud A : *Escherichia coli* et autre *Escherichia* ,*Shigella*. In Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, Précis de bactériologie clinique .2007, Edition ESKA; 989-1004.
- Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP (2006). Multicity Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Producing the Carbapenemase OXA-40. Antimicrob. Agents. Chemother. 50 : 2941-2945.
- Lonchel CM, Melin P, Gangoué-Piéboji J, Assoumou MC, Boreux R, De Mol P (2013). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Cameroonian hospitals. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 32:79-87.
- Lopez-Rojas R, Jimenez-Mejias ME, Lepe JA, Pachon J (2011). *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin alters its antibiotic resistance profile: a case report from Spain. J.Infect.Dis. 204:1147-1148
- Lowman W, Sriruttan C, Nana T, Bosman N, Duse A, Venturas J, Clay C, Coetzee J (2011). NDM-1 has arrived: first report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa. S. Afr. Med. J. 101:873-875.
- Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C (2004). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo--lactamase encoded by a conjugative plasmid. Antimicrob. Agents. Chemother. 48:648–50.

Références bibliographiques

- Lytsy B, Sandegren L, Tano E, Torell E, Andersson DI, Melhus A (2008). The first major extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS*. 116: 302-8.
- Madani N, Rosenthal V D, Dendane T, Abidi K, Zeggwagh A A, Abouqal R (2009). *Int. Arch. Med.* 2: 29.
- Mamlouk K, Boutiba-Ben Boubaker I, Gautier V, Vimont S, Picard B, Ben Redjeb S, Arlet G (2006). Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. *J. Clin. Microbiol.* 44:4049-56.
- Massova I, Mobashery S (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:1-17.
- Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y (1988). Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 32:1243-1246.
- Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM (2013). Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int.J.Infect.Dis.* 17:e739-43.
- Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Perrier Gros Claude JD, Timinouni M (2011). *Qnr* and *aac (6')-Ib-cr* types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol. (Paris)*. 59:73-8.
- Messai Y, Benhassine T, Naim M, Paul G, Bakour R (2006). Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Rev. Esp. Quimioter.* 19:144-51.
- Messai Y, Iabadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol. (Paris)*. 56:319-25.
- Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B, Reijden T, Dijkshoorn L (2013). Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. *Infect. Genet. Evol.* 14:92-97.
- Miftode E, Dorneanu O, Badescu A, Ghibu L, Leca D, Vremera T, Mereuță A (2012). Emergence of a new group CTX-M enzyme in Romania and risk factors for extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* infections. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 116:477-80.
- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43:727-37.

Références bibliographiques

- Moland ES, Black JA, Hossain A, Hanson ND, Thomson KS, Pottumarthy S (2003). Discovery of CTX-M-like extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five US States. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47:2382-3.
- Moubareck C, Doucet-Populaire F, Hamze M, Daoud Z, Weill FX (2005). First extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolate identified in Lebanon. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49:864-5.
- Mugnier PD, Poirel L, Naas T (2010). Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 16: 35-40.
- Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, Paton S (2004). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48:1204-14.
- Murray PR (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry : usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 1626–1630.
- Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P (1999). An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43:1281-4.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P (2008). Minor extended-spectrum β -lactamase. *Clinical. Microbiol. Infect.* 14 :42-52.
- Nanninga N. (1991). Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli* . *Mol. Microbiol.* 5: 791-795.
- Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S (2010). PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. *Iran J. Basic. Med. Sci.* 13 : 111-118.
- Navoa-Ng JA, Berba R, Galapia YA, Rosenthal VD, Villanueva VD, Tolentino MC, Genuino GA, Consunji RJ, Mantaring JB (2011). 3rd Device-associated infections rates in adult, pediatric, and neonatal intensive care units of hospitals in the Philippines: International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) findings. *Am. J. Infect. Control.* 39: 548-54.
- Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med. Mal. Infect.* 42:20-9.
- Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M (2013). Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* strains in Algeria. *J. Infect. Dev. Ctries.* 15:804-11.

Références bibliographiques

- Neuwirth C, Siebor E, Pruneaux M, Zarnayova M, Simonin C, Kisterman JP, Labia R (2003). First isolation of CTX-M15-producing *Escherichia coli* from two French patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:471-3.
- Nikaido H (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 15:264-382 .
- Nordmann P, Poirel L (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8 : 321-331.
- Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends. Microbiol.* 19 :588-95
- Oudhuis GJ, Verbon A, Hoogkamp-Korstanje JA, Stobberingh EE (2008). Susceptibility Surveillance Study Group. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from Intensive Care Units in The Netherlands, 1998-2005. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31:58-63.
- Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA (2001). Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 39:3747-9.
- Paterson DL, Bonomo RA (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:657–86.
- Park YS, Adams-Haduch JM, Shutt KA, Yarabinec DM 3rd, Johnson LE, Hingwe A, Lewis JS, Jorgensen JH, Doi Y (2012). Clinical and microbiologic characteristics of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* at three centers in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(4):1870-6.
- Pechère JC, Michéa-Hamzhepour M, Köhler T (1998). Antibiotic efflux, a mechanism of multiple resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Acad. Natl. Med.* 182:599-612
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical. Microbiol. REV.* 21 : 538-582.
- Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Gottig S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG (2011). Molecular characterization of bla_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1998-2001.
- Philippon A, Labia R, Jacoby G (1989). Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 33(8):1131–6.
- Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P (2008a). *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52 : 1252-1256.

Références bibliographiques

- Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P (2008b). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from Tunisia Producing the OXA-58-Like Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-97. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 52 : 1613-1617.
- Poirel L, Lebessi E, Héritier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P (2006). Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:1138-41.
- Poirel L, Ros A, Carrer A, Fortineau N, Carricajo A, Berthelot P (2011). Cross border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1181–2.
- Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P (2011a). European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:E24–6.
- Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L (2011c). Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55:4896-9.
- Potron A, Poirel L, Bussy F, Nordmann P (2011b). Occurrence of the carbapenem- hydrolyzing β -lactamase gene blaOXA-48 in the environment in Morocco. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55:5413–4.
- Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS (2000). SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44:3035–9.
- Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G (2002). Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 602-4.
- Rahel K : Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotique .2012.
- Rakotoson JL, Rakotomizao JR, Andrianarisoa AC (2010). Pneumonie aiguë communautaire : 96 observations à Madagascar. *ACF. Med. Trop.* 70 : 62-64.
- Ramdani-Bougoussa N, Mendonça N, Leitão J, Ferreira E, Tazir M, Caniça M (2006). CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol.* 44:4584-6.
- Ramdani-Bougoussa N ,Rahal K (2005) :Diagnostic bactériologique des infections broncho-pulmonaires
- Ramoul A, Hammami S, Dekhil M, Amiri S, Slim A, Boutiba-Ben Boubaker I (2013). Phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* from Algerian intensive care units. *Afr.J.Microbiol.Res.* 7:868-874

Références bibliographiques

- Reechaipichitkul W, Phondongnok S, Bourpoern J, Chaimanee P (2013). Causative agents and resistance among hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia patients at Srinagarind Hospital, northeastern Thailand Southeast. *Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 44:490-502.
- Richard C, Keredjian M. Méthodes de Laboratoire pour l'identification des bacilles à Gram négatif aérobies stricts : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*. Inst. Pasteur, 1995, 2^{ème} édition, 2 : 22-26.
- Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R (2010). Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54:466-70.
- Rodriguez-Villalobos H, Malaviolle V, Frankard J, de Mendonça R, Nonhoff C, Struelens MJ (2006). In vitro activity of temocillin against extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:771-4.
- Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1–14.
- Rolain JM, Parola P, Cornaglia G (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) : towards a new pandemia?. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:1699-1701.
- Ruppé E (2010). Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: the rise of CTX-M. *Antibiotiques.* 12:3-16.
- Salomao R, Rosenthal VD, Grimberg G, Nouer S, Blecher S, Buchner-Ferreira S, Vianna R, Maretti-da-Silva MA (2008). Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Rev Panam Salud Publica.* 24: 195-202.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74:5463-7.
- Sauer S, Kliem M (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 74–82.
- Schuetz AN, Huard RC, Eshoo MW, Massire C, Della-Latta P, Wu F, Jenkins SG (2012). Identification of a novel *Acinetobacter baumannii* clone in a US hospital outbreak by multilocus polymerase chain reaction/electrospray-ionization mass spectrometry. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 72 : 14-19.
- Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M (2010). MALDI-TOF-Mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future. Microbiol.* 5: 1733–1754.

Références bibliographiques

- Sinaii N (2010). Charting the course for the future of science in healthcare epidemiology: results of a survey of the membership of the Society of Healthcare Epidemiology of America. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 31:669-75.
- Sinha M, Srinivasa H, Macaden R (2007). Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. *Indian. J. Med. Res. J.* 126: 63-7
- Shibata N, Doi Y, Yamane K (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo--lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 41:5407–13.
- Smith CL, Cantor CR (1987). Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods. Enzymol.* 155:449-67.
- Stock I, Wiedemann B (2001). Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *J. Med. Microbiol.* 50:396-406
- Tankovic J, Mécanisme d'action des antibiotiques ; Précis de bactériologie clinique. Freney J, Renaud F, Hansen W., Bollet C, Edition ESKA 2000 :583-595
- Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, de Champs C (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27:397-402.
- Touati A, Benallaoua S, Djoudi F, Madoux J, Brasme L, De Champs C (2007). Characterization of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microb. Drug. Resist. Summer.*13:85-9.
- Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, Champs C (2008). First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60: 287–90.
- Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM (2013). Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 57:2426-7.
- Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, Rolain J.M (2012). 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.* 40:89-91.
- Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry N.K, Fusing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:1-46.

Références bibliographiques

- Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42 : 4769–75.
- Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2:203.
- Von Baum H, Welte T, Marre R, Suttorp N, Ewig S (2010). Community-acquired pneumonia through Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: diagnosis, incidence and predictors for the CAPNETZ study group. *Eur. Respir. J.* 35: 598–605
- Walther-Rasmussen J, Høiby N(2006). OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57 :373-83.
- Wang A ,Yang Y ,Lu Q , Wang Y , Chen y , Deng L, Ding H,Deng Q , Wang L ,Ang Chen X (2008). Occurance of qnr-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBLE or Amp pC-type β -lactamase from five pediatric hospitals in China. *FEMS. Microbiology. Letters.* 283 :112-116.
- Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, Xu Y, Zhu Y(2007). Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese Hospitals. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51 : 4022–4028.
- Wang H ,Kelka S , Wu W ,Chen M , Quinn J P (2003). Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamases: Prevalence of CTX-M-3 at a Hospital in China. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 790–793.
- Wang J, Zhou N, Xu B, Hao H, Kang L (2012). Identification and Cluster Analysis of *Streptococcus pyogenes* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS. One* 7: e47152.
- Wei C, Cheng Z, Zhang L, Yang J (2013). Microbiology and prognostic factors of hospital- and community-acquired aspiration pneumonia in respiratory intensive care unit. *Am. J. Infect. Control.* 41 .880-884.
- Weill FX, Perrier-Gros-Claude JD, Demartin M, Coignard S, Grimont PA (2004). Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing strains of *Salmonella enterica* isolated in France and Senegal. *FEMS. Microbiol. Lett.* 238:353-8
- Wolf B, Rey LC, Moreira LB, Milatovic D, Fleer A, Verhoef J, Roord JJ (2001). Carriage of gram-negative bacilli in young Brazilian children with community-acquired pneumonia. *Int. J. Infect. Dis.* 5:155-9.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF , Ward ME , Brown S, Amyes SGB, Livermore DM (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 27 : 351–353

Références bibliographiques

- Xia S, Hendriksen RS, Xie Z, Huang L, Zhang J, Guo W, Xu B, Ran L, Aarestrup FM (2009). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from infections in humans in Henan Province, China. *J. Clin. Microbiol.* 47:401-9.
- Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, Satoh K, Washidu R, Kinoshita S, Aihara M (2003). Production of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase and IMP-1 metallo beta-lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:631-8.
- Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ (2001). Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-8 in a university medical center in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 39:4433-9.
- Yong D, Lim YS, Roh KH, Choi YS, Park DY, Yum JH, Kim JM, Lee K, Chong Y (2006) The first detection of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase among diverse beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* clinical isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 54:237-9.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR (2009). 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.* 53:5046-5054.
- Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5: 335-341.
- Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagacé-Wiens P, Nichol KA, Wierzbowski A, Baudry PJ, Taylor F, Karlowsky JA, Walkty A, Schweizer F, Johnson J; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance, Hoban DJ (2010). Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54:4684-93.
- Zhou T, Zhang X, Guo M, Ye J, Lu Y, Bao Q, Chi W (2013). Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae from a teaching hospital in Wenzhou, southern China. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66:96-102.

Résumé

Les pneumonies nosocomiales sont la principale cause d'infection nosocomiale dans les unités de soins intensifs, elles sont liées à la ventilation artificielle. Les bactéries responsables d'infections nosocomiales au cours de la ventilation mécanique sont essentiellement les bacilles à Gram négatif (BGN): *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries. La résistance aux antibiotiques des BGN est devenue un problème majeur de santé publique.

L'objectif de ce travail est d'évaluer le taux, le support génétique de la résistance aux antibiotiques et l'épidémiologie moléculaire d'une série de 95 de souches bactérienne (42 souches d'entérobactéries, 23 d'*A. baumannii*, 22 *P. aeruginosa* et 8 *S. aureus*) responsables de pneumonie isolées dans le laboratoire de microbiologie du centre hospitalo-universitaire, Dr Dorban Annaba, Algérie, entre Janvier 2010 et Octobre 2011, par des techniques phénotypiques et génotypiques.

L'identification des souches a été effectuée par Api 20E, Api 20NE, Api Staph et MALDI-TOF Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé par la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches résistantes ont été déterminées par la technique de dilution en milieu gélosé et E-test. Les gènes codants pour les β -lactamases ont été recherchés par des outils de biologie moléculaire (PCR standard, PCR en temps réel, séquençage). La détermination des relations entre les souches clonales a été réalisée par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) après macro-restriction par l'enzyme *Apa1*.

Toutes les souches ont montré un haut niveau de résistance à tous les antibiotiques testés principalement aux β -lactamines sauf les *P. aeruginosa* qui ont présenté un faible taux de résistance aux antibiotiques, les valeurs des concentrations minimales inhibitrices obtenues ont montrés: entérobactéries (Cefotaxime $CMI_{50} \geq 4048$ mg/l) et imipeneme $CMI_{50} = 128$ μ g/ml pour *A. baumannii*. Le séquençage des produits d'amplification de gènes *bla* a montré la présence du gène CTX-M15 (86,95%), SHV-11(23,80%), SHV-12 (38%), TEM-1 (4,76%) chez nos souches d'entérobactéries ce qui explique le taux élevé de résistances aux β -lactamines.

La résistance des *A. baumannii* aux carbapénèmes est liée à la sécrétion de plusieurs carbapénémases essentiellement OXA-23 (60.86%). D'autre carbapénémases ont été trouvées : OXA-24, OXA-58 et NDM-1.

La dissémination des CTX-M-15 et OXA-23 dans le service de réanimation est liée à la possibilité de transfert horizontale de ces gènes et la capacité de ces bactéries à acquérir de nouveau gènes. Nos résultats signalent l'urgence de contrôler la diffusion des BMR et la prescription des antibiotiques en ville et à l'hôpital.

Mots clés : BGN, résistance, profil moléculaire, OXA-23, CTX-M15, IRB, réanimation.

Summary

Nosocomial pneumonia is the leading cause of nosocomial infection in intensive care units; they are related to mechanical ventilation. The bacteria responsible for nosocomial infections during mechanical ventilation are mainly Gram-negative bacilli (GNB): *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae. Antibiotic resistance of BGN become a major problem in public health.

The objective of this study is to evaluate the rate, the genetic support of antibiotic resistance and molecular epidemiology of a series of 95 strains (42 Enterobacteriaceae, 23 *A. baumannii*, 22 *P. aeruginosa* and 8 *S.aureus*) responsible for pneumonia isolated in the microbiology laboratory of the hospital university, Dr. Dorban Annaba, Algeria, between January 2010 and May 2011, by phenotypic and genotypic techniques.

The identification of the strains was performed by API 20E, API 20NE and MALDI-TOF. The antibiotic susceptibility test was performed by the disk diffusion method in agar, minimum inhibitory concentrations (MICs) of resistant strains were determined by the technique of dilution in agar. β -lactamase encoding genes of Ambler class A and D were searched by molecular biology tools (PCR, sequencing). The determination of the relationship between clonal strains was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) after macro-restriction enzyme Apal.

All strains showed a high level of resistance to all antibiotics tested mainly to β -lactams except *P. aeruginosa* showed a low rate of antibiotic resistance, the values of minimum inhibitory concentrations obtained showed: Enterobacteriaceae (cefotaxime MIC₅₀ \geq 4048 mg / l) and imipenem MIC₅₀ = 128 g / ml for *A. baumannii*. The sequencing of the *bla* gene amplification products showed the presence of CTX-M15(86,95%), SHV-11(23,80%), SHV-12(38%), TEM-1 (4,76%) in our strains of Enterobacteriaceae which explains the high rate of resistance to β -lactam.

The resistance of *A. baumannii* to carbapenem is related to the secretion of several carbapenemases OXA-24, OXA-58 and NDM-1 and essentially OXA-23 (60.86%).

The dissemination of CTX-M15 and OXA-23 in the intensive care unit is linked to the possibility of horizontal transfer of these genes and the ability of these bacteria to acquire a new gene. Our results indicate the urgency of controlling the spread of BMR and prescription of antibiotics in the city and the hospital.

Keywords: BGN, resistance, molecular profile, OXA-23, CTX-M 15, IRB , reanimation.

الملخص:

الإلتهابات الرئوية المكتسبة هي السبب الرئيسي في الإلتهابات المكتسبة في وحدات العناية المركزة لأنها متصلة بالتهوية الميكانيكية. البكتيريا المسؤولة على الإلتهابات المكتسبة خلال التهوية الميكانيكية هي أساسا عصيات غرام السلبية " *Acinetobacter baumannii* , *Pseudomonas aeruginosa* entérobactéries ."

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النسبة و الحوامل الجينية (الوراثية) للمضادات الحيوية و علم الأوبئة الجزئي لسلسلة 95 من عصيات غرام السلبية (*42 entérobactéries*, 8 *S. aureus*, 23 *A. baumannii* 22 *P. aeruginosa*.) المعزولة في مختبر علم الأحياء الدقيقة للمستشفى الجامعي الدكتور دربان' عنابة ' الجزائر من يناير 2010 إلى يوليو 2011 بواسطة تقنيات ظاهرية و جينية.

تم التعرف على السلالات عن طريق Api 20E, Api Staph, Api 20NE et MALDI-TOF و إجراء إختبار الحساسية للمضادات الحيوية عن طريق بث قرص المضادات الحيوية على الجيلوز و التركيزات الأدنى المثبطة عن طريق تخفيف التركيزات على الجيلوز. تم البحث على الجينات المسؤولة على البيتاالكتاماز من الفئة A و B عن طريق أدوات البيولوجية الجزئية (PCR, sequencing). كما تم إجراء تحديد العلاقة بين السلالات النسبية على طريق (PFGE) بعد الماكروتجزئة بالأنزيم *Apal* .

جميع السلالات كانت على المستوى عالي من المقاومة للمضادات الحيوية خاصة للبيتاالكتامين بإستثناء (*P. aeruginosa*) التي أظهرت إنخفاض في مستوى المقاومة للمضادات الحيوية و تظهر قيم التركيزات الأدنى المثبطة المتحصل عليها (Cefotaxime $CMI_{50} \geq 4048$ mg/l) et imipenem $CMI_{50} = 128$ µg/ml:

اليات علم الأحياء الجزئية أثبتت وجود الجينات

المستوى العالي للمقاومة لعائلة البيتاالكتامين. CTX-M15(86,95%), SHV-11(23,80%), SHV-12(38%), TEM-1(4,76%) - بين السلالة entérobactéries وهذا يفسر

أما مقاومة *A. baumannii* للكاربابينام فهو متصل بإفراز العديد من الكاربابينيماز, OXA-24,

OXA-58 and NDM-1 و خاصة OXA-23 (60.86%)

إن انتشار CTX-M15 و OXA-23 في قسم العناية المركزة مرتبط بأمكانية النقل الأفقي لهذه الجينات و قدرة البكتيريا على الحصول على جينات جديدة. BMR والمستشفى المدينة في الحيوية للمضادات طبية وصفة انتشار لمكافحة الملحة حاجة الى إتنااتنا

Full Length Research Paper

Phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* from Algerian intensive care units

A. Ramoul¹, S. Hammami^{2*}, M. Dekhil⁴, S. Aimiri⁴, A. Slim^{2,3} and I. Boutiba-Ben Boubaker^{2,3}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba Algeria.

²Laboratory of Antimicrobial Resistance, Faculty of Medicine of Tunis –Tunisia University of Tunis El Manar, 15 Rue Djebel Akhdhar - The Rabta - BabSaadoun 1007 -Tunis, Tunisia.

³Laboratory of Microbiology of Charles Nicolle Hospital, Boulevard April 9, 1006 Tunis, Tunisia.

⁴Laboratory of Microbiology, Dr Dorban University Hospital of Annaba Algeria.

Accepted 21 February, 2013

The aim of this study was to evaluate molecular epidemiology and mechanisms of β -lactams resistance in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains causing pneumoniae in two intensive care units (ICUs) of two Algerian University hospitals. Between January 2010 and May 2011, 23 strains were collected. Antibiotics susceptibility testing was performed by the disk diffusion method and agar dilution technique. *bla*_{DXA-23}, *bla*_{DXA-24}, *bla*_{DXA-28}, *bla*_{DXA-51}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{PER} β -lactamase genes were searched by polymerase chain reaction and sequencing. Clonally, relationships between strains were performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) after macro-restriction by *Apal* enzyme. Nineteen (19) strains were resistant to all β -lactams, two were susceptible only to carbapenems. They also exhibited resistance to the majority of the other antibiotics tested, except to colistin. *bla*_{DXA-51} gene was found in all isolates, *bla*_{DXA-23} in 14, and *bla*_{TEM-1} in three. PFGE analysis showed different patterns in one ICU; however, a clonal diffusion was identified in the second ICU. These results underline the necessity of a surveillance program that would include monitoring of ICU-acquired infections, antibiotic usage and molecular typing of multidrug resistant *A. baumannii* isolates.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, multidrug resistance, β -lactamases, epidemiology.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is one of the most opportunistic pathogens responsible for serious infections in intensive care units (ICUs) (Schuetz et al., 2012; Dijkshoorn et al., 2007). Pneumonia is the most reported infection, particularly in mechanically ventilated patients (Corbella et al., 2000). *A. baumannii* is responsible for 7.8 to 23% of mortality by acquired pneumonia in the hospitals and 10 to 43% in ICUs (Kempf et al., 2012; Falagas et al., 2006). *A. baumannii* exhibits a remarkable ability to rapidly develop antibiotic resistance that led to multidrug resistance (MDR) within a few decades (Kusradze et al.,

2011). To date, some strains of *A. baumannii* have become almost resistant to all currently available antibacterial agents (Wang et al., 2007; Dijkshoorn et al., 1996; Magiorakos et al., 2012) mostly through the acquisition of mobile genetic elements carrying clusters of genes encoding resistance to several antibiotic families at once, making it more complex both in regards of the prevention and treatment (Ben et al., 2011).

The main mechanism of resistance to β -lactams in *A. baumannii* is enzymatic degradation by β -lactamases (Zarrilli et al., 2009). AmpC cephalosporinase is chromosomally encoded by *A. baumannii*, other extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) like TEM-92, TEM-116, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-43, VEB-1, PER-1, PER-2 and a narrow-spectrum β -lactamases like TEM-1 and TEM-2 have been described (Peleg et al., 2008).

*Corresponding author. E-mail: hammadisamia@yahoo.fr. Tel: 00216 98 901 907. Fax: 00216 71 568 744.

Table 1. Primer pairs used for the amplification of β -lactamases gene.

<i>bla</i> gene	Primer	Sequence 5' to 3'	Gene size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51like-F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353	Feizabadi et al. (2008)
	OXA-51like-R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23like-F	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501	Feizabadi et al. (2008)
	OXA-23like-R	ATT TCT GAC CGC AT TTC CAT		
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	OXA-24like-F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246	Feizabadi et al. (2008)
	OXA-24like-R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT		
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA-58like-F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599	Feizabadi et al. (2008)
	OXA-58like-R	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC		
<i>bla</i> _{TEM}	OT3	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	850	Ktari et al. (2006)
	OT4	CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG		
<i>bla</i> _{SHV}	OS5	TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC	800	Ruppé et al. (2009)
	OS6	GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG		
<i>bla</i> _{CTX-M}	MA-1	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA	550	Poirel et al. (2000, 2008a, b, 2006)
	MA-2	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG		
<i>bla</i> _{PER}	PER UP	ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC	927	Nasehi et al. (2010)
	PER LOW	AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA		

Oxacillinases found in *A. baumannii* can be sub-divided into five distinct groups: intrinsic OXA-51-like and acquired, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like and OXA-143; (Ansaldi et al., 2011; Higgings et al., 2009). Metallo- β -lactamases (MBLs) have been identified in *A. baumannii* such as IMP, VIM, SIM (Bou et al., 2000) and recently NDM-1, NDM-2 (Pfeifer et al., 2011; Boulanger et al., 2012) and KPC (Robledo et al., 2011; Azimi et al., 2012).

This work constitutes the first molecular research in Algeria on the resistance of *A. baumannii* to β -lactams. The aims of this study was to evaluate molecular epidemiology and mechanisms of β -lactams resistance in MDR *A. baumannii* strains isolated in the microbiological laboratory of Doctor Dorban University hospital of Annaba, Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Twenty three (23) non redundant multidrug resistant *A. baumannii* isolated from protected distal bronchial sampling of 23 patients hospitalized in two intensive care units (5 in IBN ROCHED Hospital and 18 in IBN SINA Hospital) were collected between January 2010 and May 2011. The isolates were obtained from patients belonging to different age groups: 18 adults (20 to 92 years) and five children (2 to 14 months); seven females and 16 males. Strain identification was performed by standard techniques and the analytical profile index procedure (API 20NE system; bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and confirmed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the endogen *bla*_{OXA-51-like} (Donald et al., 2000).

Antibiotic susceptibility testing

The disk diffusion method on Mueller-Hinton agar was employed to evaluate susceptibility to the following antimicrobial agents: ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin, piperacillin-

tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, aztreonam, cefsulodin, gentamicin, tobramycin, netilmicin, amikacin, kanamycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tigecycline and colistin. MIC values of ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, ceftazidime, aztreonam, imipenem, meropenem and cefepime were determined by agar dilution technique. MBLs production was detected using the imipenem-EDTA disk synergy test (Pitout et al., 2007).

Current quality control testing was performed using the following organisms: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25923. The interpretation of the results was referred to the guidelines defined by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011).

PCR amplification and sequencing

Genomic DNA of the isolates was extracted to amplify seven genes encoding acquired β -lactamases (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{PER}). Simplex PCR assays were run using primers listed in Table 1, as previously described (Peleg et al., 2008).

PCR products from representative strains were purified using a purification Kit (Qiagen). DNA sequencing was performed by the dideoxy chain terminator method with Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed using an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). Similarity searches and alignments of both the nucleotide sequences were performed with the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Carvalho et al., 2009; Hammami et al., 2011).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Isolates were typed by PFGE following digestion of intact genomic DNA with Apal (BioRAD, Marnes la Coquette, France). DNA fragments were separated on 1% (w/v) agarose gels in 0.5% TBE buffer using a CHEF DRILL apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) with 6 V/cm, pulsed from 5 to 20 s, for 22 h at 14°C. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light. The Apal restriction profiles were compared by visual inspection according to the criteria by Van Belkum et al. (2007).

Table 2. Antimicrobial susceptibility and beta-lactams MICs values of the 23 *A. baumannii* isolates.

Strain number	Antibiotic resistance profile	MIC value ($\mu\text{g/l}$)						
		TIC	TCC	CAZ	FEP	IMP	MER	AZT
1	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-ATM-FEP-GM	2048	512	512	64	2	1	256
2	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-K-NA-CIP	>2048	>1024	512	64	128	32	512
3	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	256	256	64	>512
4	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-K	2048	>1024	256	256	128	32	512
5	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-NA-CIP	>2048	>1024	512	>512	128	32	512
6	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-ATM-FEP-GM-TM-K-NA-CIP	1024	128	512	128	2	4	512
7	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM	512	512	512	>512	64	16	512
8	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	256	>2048	64	16
9	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-NA-CIP	1024	1024	256	256	128	32	>512
10	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	>512	64	16	>512
11	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	128	128	32	512
12	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-TM-K-NA-CIP	2048	>1024	>2048	>512	128	32	512
13	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-TM-K-NA-CIP	1024	1024	512	128	8	4	512
14	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	256	256	32	512
15	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	>512	256	64	512
16	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-K-NA-CIP	2048	1024	>2048	>512	256	32	512
17	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	>512	256	64	512
18	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-NA-CIP	>2048	>1024	256	128	256	32	512
19	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-NA-CIP	2048	1024	256	256	128	32	512
20	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	64	128	64	512
21	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-TM-AN-K-NA-CIP	2048	>1024	256	64	128	32	512
22	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-AN-K-NA-CIP	>2048	>1024	>2048	256	256	64	>512
23	TC-TCC-PIP-TZP-CAZ-IMP-MER-ATM-FEP-GM-TM-AN-K-NA-CIP	512	512	>2048	512	128	32	16

TIC, ticarcillin; TCC, ticarcillin-clavulanic acid; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; ATM, aztreonam; GM, gentamicin; TM, tobramycin; AN, amikacin; K, kanamycin; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin.

RESULTS

Resistance phenotype for *A. baumannii*'s strains

Antibiogram data determined by the disk diffusion method and interpreted according to the guidelines defined by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) revealed that all strains of *A. baumannii* were resistant to ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime and aztreonam. Only two strains were susceptible to carbapenems, no strain was resistant to colistin, netilmicin and tigecyclin (Table 2). The resistance to β -lactams of 23 *A. baumannii* strains was confirmed by MICs values (Table 2).

PCR amplification of β -lactamase genes and sequencing

All strains were positive for *bla*_{OXA-51} gene, confirming the strain identification. PCR and sequencing confirmed the

presence of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{TEM-1} in 14 (Figure 1) and three strains (Figure 2), respectively. However, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{PER}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} were not detected in any of our isolates. Two strains contained both *bla*_{OXA-23} and *bla*_{TEM-1} (Table 3).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Among the 23 strains, only 19 were typed by PFGE. Seven different profiles were detected. Strains isolated at Ibn Roched Hospital showed three different profiles patterns (C, E and G). However, in Ibn Sina Hospital, four genotypes were identified (A, B, F and D); genotype A: A₁ (n= 5) and A₂ (n=5) was found as the most common cluster type (10/16) with 60% harboring the gene *bla*_{OXA-23}, followed by B cluster: B₁ (n=2) and B₂ (n=2) (Table 3).

DISCUSSION

Acinetobacter are widely distributed in nature; they are

Table 3. MDR *A. baumannii* strains: Demographic data and molecular characterization.

Hospital	Strain number	Age	Sex	Date of isolation	<i>bla</i> genes			PFGE pattern
					OXA-51	TEM-1	OXA-23	
Ibn Roched Hospital	1	5M	M	21/01/2010	+	+		ND
	2	14M	M	13/04/2010	+			ND
	3	4 M	F	29/06/2010	+		+	E
	4	2 M	F	18/11/2010	+			G
	5	6M	F	05/01/2011	+		+	C
Ibn Sina Hospital	6	38Y	F	17/01/2010	+			A ₁
	7	89Y	M	19/01/2010	+		+	A ₁
	8	24Y	M	03/02/2010	+		+	D
	9	48Y	M	04/02/2010	+		+	ND
	10	20Y	F	15/02/2010	+			B ₂
	11	58Y	M	17/02/2010	+		+	A ₁
	12	56Y	M	08/03/2010	+	+	+	B ₁
	13	52Y	M	09/03/2010	+			B ₁
	14	74Y	M	22/04/2010	+		+	ND
	15	35Y	M	25/05/2010	+		+	A ₂
	16	71Y	M	13/06/2010	+	+	+	A ₂
	17	34Y	M	17/06/2010	+		+	A ₁
	18	29Y	F	06/09/2010	+		+	A ₂
	19	63Y	M	24/10/2010	+			A ₂
	20	92Y	M	07/11/2010	+			A ₁
	21	21Y	M	07/11/2010	+		+	F
	22	73Y	M	19/11/2010	+		+	A ₂
	23	32Y	F	01/05/2011	+			B ₂

M, Man; F, Female; ND, not determined; M, months; Y, years.

endogenous organisms in various types of soil and water (Peleg et al., 2008). *A. baumannii* have been associated with healthcare-associated infections, especially in debilitated patients. The main sites of infection are the respiratory tract, urinary tract, bloodstream, wounds, and burns. Patients with burns and those in intensive care units and/or using mechanical ventilation are at greater risk (Kempf et al., 2012; Kusradze et al., 2011). An increase in the prevalence of resistant strains has been seen worldwide and treatment of multidrug-resistant strains can be difficult (Drissi et al., 2010; Magiorakos et al., 2012). The carbapenems have been the drug of choice against this pathogen, but the number of isolates resistant to these antimicrobial agents has considerably increased (Ben et al., 2011; Poirel et al., 2008a).

The present study aimed to define the genetic basis of 23 MDR *A. baumannii* strains isolated in 2 ICUs of two Algerian hospitals. They caused pneumonia in debilitated patients using mechanical ventilation.

All strains were resistant to the most antimicrobials tested mainly to β -lactamin. In this study, we report a high prevalence of imipenem-resistant (91.30%). There is only few data available on carbapenem-resistance in *A. baumannii* from North Africa, especially in Algeria, that the percentage of imipenem-resistant *A. baumannii*

strains differed among countries and ranged from 5.2% in Algeria to 28.8% in Tunisia (Amazian et al., 2006). No strain was resistant to colistin. Despite its renal toxicity, colistin has become useful antibiotic for treating infections caused by carbapenem resistant pathogens (Lolans et al., 2006; Nordmann et al., 2002), but dissemination of *A. baumannii* resistant to colistin is worrying. In another side, many studies provide the activity of tigecycline against multidrug *A. baumannii* clinical isolates (Kempf et al., 2012; Betriu et al., 2002). All our strains were susceptible to this novel antibiotic.

Majority of the isolates exhibited resistance to other antibiotics such as, aminoglycosides and quinolones; carbapenem resistance in *A. baumannii* is associated with a variety of combined mechanisms. The major mechanism is the production of carbapenem hydrolyzing β -lactamases. These specific groups of β -lactamases are categorized into class B metallo β -lactamases (MBLs) and most frequently class D (oxacillinases) (Kempf et al., 2012). Other mechanisms include efflux pump, loss or low level expression of 29 kDa (CarO), 33-39 kDa, and 43 kDa (homologous to *P. aeruginosa* imipenem resistance protein, OprD) proteins, and altered affinity in penicillin binding proteins (PBPs) (Ben et al., 2011; Peleg et al., 2008).

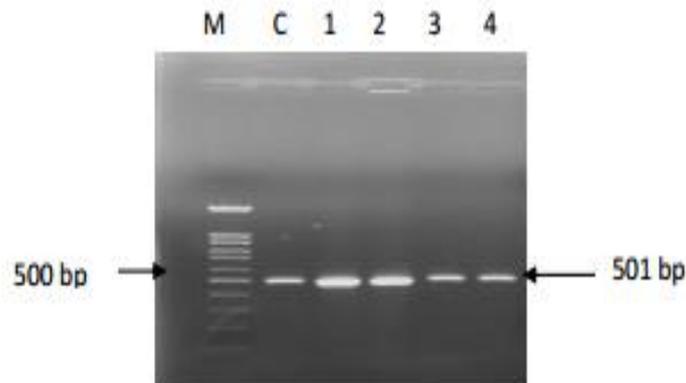


Figure 1. PCR detection of *bla_{OXA-23-*bla*}* gene. M, 100 pb DNA ladder (Promega); C, positive control; 1-4, representative strains tested.

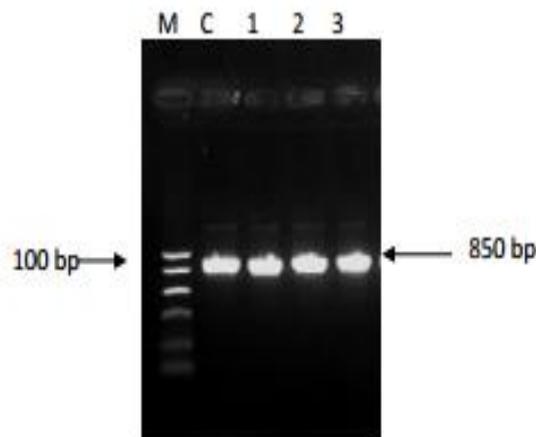


Figure 2. PCR detection of *bla_{YIM}*. M: ϕ x174 (Promega); C: positive control harbouring *bla_{YIM}*; 1-3, representative strains tested.

The *bla_{OXA-51}* gene, considered as a natural component of the species chromosome has been used to identify *A. baumannii* (Carvalho et al., 2009). This gene may be associated with resistance to carbapenems when ISAbal-type insertion sequences, which carry strong promoters, are found upstream to *bla_{OXA}* gene, resulting in increased expression and concomitant resistance to carbapenems (Heritier et al., 2006). In seven strains, where only *bla_{OXA-51}* was detected, resistance can be explained by non enzymatic mechanisms (Peleg et al., 2008) or insertion of ISAbal sequences (Kusradze et al 2011; Heritier et al., 2006).

Some studies showed that the presence of ISAbal upstream to *bla_{AmpC}* was correlated with cefepime resistance (Lin et al., 2011). All our strains were also resistant to cefepime, but this insertion sequence was not searched in our strains.

The first identified OXA-type enzyme with carbapenem-hydrolyzing activity was from a clinical *A. baumannii*

strain isolated in 1985 from Edinburgh, Scotland. The plasmid-encoding this resistance determinant, initially named ARI-1, was found to be transferable, and the gene was later sequenced and named *bla_{OXA-23}* (Donal et al., 2000; Nordman et al., 2000). Of note, the origin of *bla_{OXA-23}* was recently identified as the chromosome of *Acinetobacter radioresistens*, a commensal species of the human skin (poirel et al., 2008a, b). This enzyme type now contributes to carbapenem resistance in *A. baumannii* globally, causing nosocomial outbreaks or sporadic infections (Ben et al., 2011; Kempf et al., 2012). To the best of our knowledge, the first *A. baumannii* clinical strain harboring *bla_{OXA-23}* identified in Algeria was in 2004 (Mugnier et al., 2010).

Among the five oxacillinase groups found in *A. baumannii*, apart from the intrinsic OXA-51 enzyme, only OXA-23 was detected in our strains (14 strains), the OXA-23 group was identified worldwide (Mugnier et al 2010). However, *bla_{OXA-24_{III}}* and *bla_{OXA-58_{III}}* were not

detected in any of our strains. OXA-24-like enzymes were found in Spain, Belgium, Portugal, the Czech Republic, Georgia, France and the USA; and OXA-58-like enzymes were identified in France, Spain, Belgium, Italy, Australia, USA (Kempf et al., 2012), including Algeria (Drissi et al., 2010, Touati et al., 2012), Tunisia (Poirel et al., 2006, 2008a,b, 2000) and recently in Turkey (Metan et al., 2012). Usually, OXA-type enzymes exhibit a weak hydrolysis of carbapenems and may not always show resistance profile, but when they are associated with insertion elements, they may have an increase in its expression and show resistance to carbapenems (Heritier et al., 2006). Further investigations are necessary to explore the genetic environment of *bla*_{OXA} in our strains. MBL production was not detected in any of our strains (negative imipenem-EDTA synergy test).

Other β -lactamases have been reported in *A. baumannii*. These include the TEM-1 type, SHV type, CTX-M type, PER-1, and VEB-1 β -lactamases (Peleg et al., 2008). Although they are important, it is difficult to assess their impact on resistance in the presence of the AmpC cephalosporinase (Corvec et al., 2003). Three of our strains possess *bla*_{TEM-1}.

However, *bla*_{PER}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} were not detected in any of our isolates. A recent study has reported that the prevalence of *bla*_{TEM-1} genes analyzed by multiplex-PCR-based (Woodford et al., 2006) among *A. baumannii* isolates in Kaohsiung Armed Forces General Hospital (Kaohsiung, Taiwan) was 79.40% (Ben et al., 2011). The same study has showed that in multidrug resistant *A. baumannii*, the presence of *bla*_{TEM-1} predicts resistance to ceftazidime. Strain 1, harboring only *bla*_{TEM-1} was resistant to all β -lactams except carbapenems (Tables 2 and 3).

Strains isolated at Ibn Sina Hospital showed the dissemination of the genotype A which was the most common cluster type (10/16) followed by B cluster (4/16). However, different PFGE patterns were found in Ibn Roched Hospital. These data can be related to the dissemination characteristics of this microorganism, its permanence for long periods in hospitals, its main form of dissemination, human contact, and the mobility of patients and staff (Mugnier et al., 2010; Lin et al., 2011).

Conclusion

The identification of *bla*_{OXA-23} in this study confirms the wide geographical distribution of carbapenemases among *A. baumannii* as well as their parallel appearance in outbreak strains. Additionally, it is important to follow antibiotic restriction policies to avoid excessive use of carbapenem and other broad spectrum antibiotics in our country. Also, it is of great importance to study the local epidemiology of *A. baumannii* isolates to establish the best treatment and use the correct epidemiological control.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financed by grants from the Ministry of Scientific Research, Technology and Competence Development of Tunisia. We would like to thank the technical assistance by members of the Microbiological Laboratory team of Charles Nicolle Hospital of Tunis-Tunisia.

REFERENCES

- Amazian K, Fendri C, Missoum MF, Bouzouia N, Rahal K, Savy A, Saadallah-Elahi M, Fabry J (2006). Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:340-343.
- Ansaldi F, Canepa P, Bassetti M, Zancoli M, Molinari MP, Talamini A, Ginocchio F, Durando P, Mussap M, Orongo G, Viscio C, Icardi G (2011). Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation. *J. Hosp. Infect.* 79:134-140.
- Azimi L, Alaghebandan R, Mohammadpoor M, Rastegar Lari A (2012). Identification of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Burned Infant: A Case Report. *J. Med. Bacteriol.* 1:46-49.
- Ben RJ, Yang MC, Hsueh JC, Shiang JC, Chien ST (2011). Molecular characterization of multiple drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in southern Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38:403-408.
- Betriu C, Rodríguez-Avilal I, Sánchez BA, Gómez M, Álvarez J, Picazo JJ (2002). In Vitro Activities of Tigecycline (GAR-936) against Recently Isolated Clinical Bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46:892-895.
- Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P (2012). NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 56:2214-2215.
- Carvalho KR, D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Peirano G, Galvão dos Santos LC, Felix Pereira MJ, Assensi MD (2009). Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34:25-28.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement M100eMS21. CLSI document. Wayne, PA.
- Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J (2000). Emergence and Rapid Spread of Carbapenem Resistance during a Large and Sustained Hospital Outbreak of Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 38:4086-4095.
- Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A (2003). AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:629-635.
- Dijkshoorn L, Nemeč A, Siefert H (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:939-951.
- Dijkshoorn L, Aucklen H, Gemer-Smith P, Janssen P, Kaufmann ME, Garzaiz J, Ursing J, Pitt TL (1996). Comparison of outbreak and non outbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 34:1519-1525.
- Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK (2000). Sequence Analysis of ARI-1, a Novel OXA β -Lactamase, Responsible for Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:196-199.
- Drissi M, Poirel L, Mugnier PD, Ahmed ZB, Nordmann P (2010). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29:1457-1458.
- Falagas ME, Kopterides P, Siempos II (2006). Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients. *Clin. Infect. Dis.* 43:389-390.

- Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M (2008). Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla_{OXA}* genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran Hospitals. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61:274-278.
- Hammami S, Ghozzi R, Saldani M, Ben Redjeb S (2011). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in Tunisia. *Tunis. Med.* 89:638-643.
- Herfiter C, Polrel L, Nordman P (2006). Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:23-13.
- Higgins PG, Polrel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H (2009). OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53:5035-5038.
- Kempf M, Rolain JM (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agent* 10:105-114.
- Ktari S, Ariet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, Bouaziz M, Hammami A (2006). Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50:4198-4201.
- Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM (2011). Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *Int. J. Antimicrob. Agent* 38:164-168.
- Lin MF, Kuo HY, Yeh HW, Yang CM, Sung CH, Tu CC, Huang ML, Liou LM (2011). Emergence and dissemination of *bla_{OXA-23}*-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* sp in a regional hospital in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 44:39-44.
- Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP (2005). Multicity Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Producing the Carbapenemase OXA-40. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50:2941-2945.
- Maglorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falaqas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268-281.
- Melan G, Sariguzel F, Sumerkan B, Reijden TV, Dijkshoom L (2012). Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* 3 isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. *Infect. Genet. Evol.* 14:92-97.
- Mugnier PD, Polrel L, Naas T (2010). Worldwide dissemination of the *bla_{OXA-23}* carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16:35-40.
- Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S (2010). PER, CTX-M, TEM and SHV β -lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. *J. Basic. Med. Sci.* 13:111-118.
- Nordmann P, Polrel L (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8:321-331.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538-582.
- Pfeifer Y, Wilham G, Zander E, Wichelhaus TA, Götting S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG (2011). Molecular characterization of *bla_{OXA-1}* in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1998-2001.
- Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL (2007). Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45:294-298.
- Polrel L, Figueredo S, Cattolr V, Carattoli A, Nordmann P (2008a). *Acinetobacter radiorisistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52:1252-1256.
- Polrel L, Nordman P (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:826-883.
- Polrel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P (2008b). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from Tunisia Producing the OXA-58-Like Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-97. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1613-1617.
- Polrel L, Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P (2000). Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:622-632.
- Robledo IE, Aquino EE, Va'zquez GJ (2011). Detection of the KPC Gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-Based Nosocomial Surveillance Study in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2968-2970.
- Ruppé E, Hem S, Lath S, Gautier V, Arley F, Sarthou JL, Monchy D, Ariet G (2009). CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1080-6059.
- Schuetz AN, Huard RC, Eshoo MW, Massie C, Della-Latta P, Wu F, Jenkins SG (2012). Identification of a novel *Acinetobacter baumannii* clone in a US hospital outbreak by multilocus polymerase chain reaction/ electrospray-ionization mass spectrometry. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 72:14-19.
- Touati M, Diene S, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, Rolain J-M (2012). Emergence of *bla_{OXA-23}* and *bla_{OXA-58}* carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40:89-91.
- Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoom L, Haeggen S, Cookson B, Fry N.K, Fussing V, Green J, Fell E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:1-46.
- Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, Xu Y, Zhu Y (2007). Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4022-4028.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore DM (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:351-353.
- Zarilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5:335-34.