

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Badji Mokhtar Annaba

Badji Mokhtar University Annaba

جامعة باجي مختار عنابة



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie appliquée

THESE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN MICROBIOLOGIE

Option: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Thème

Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de
***Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville**
d'Annaba

Présentée par : Zineb BELBEL

Devant le jury :

Président :	Pr. Zidane BRANES	Université d'Annaba
Directrice de thèse:	MC_A. Houria CHETTIBI	Université d'Annaba
Examinatrice :	Pr. Djamila GACEMI-KIRANE	Université d'Annaba
Examinatrice :	Pr. Nafissa ABBACI	Université d'Annaba
Examineur :	Pr. Abdelaziz TOUATI	Université de Bejaia
Examineur :	Pr. Djamel Eddine BENOURETH	Université de Guelma
Invité :	Pr. Jean Marc ROLAIN	Université d'Aix-Marseille

Année universitaire: 2013/2014

Remerciements

Tout d'abord, Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude au Professeur Jean-Marc Rolain pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser la plus importante partie de ma thèse dans son unité de recherche. J'ai pu bénéficier de ses précieux conseils, de son sens critique et de sa rigueur dans le travail.

J'exprime ensuite mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse Houria Chettibi, Maitre de Conférences de classe A, pour m'avoir encadrée, conseillée et encouragée tout au long de ce travail.

Je tiens aussi à remercier vivement le Professeur Mazouz Dekhil pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire où j'ai pu réaliser la première partie de mon travail.

J'adresse mes vifs remerciements par ailleurs au :

- *Professeur Zidane Branes, pour avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de présider le jury.*
- *Professeur Djamila Gacemi-Kirane, Responsable de la Formation Doctorale, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de participer à mon jury de thèse.*
- *Professeur Nafissa Abbaci-Boutefnouchet pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.*
- *Professeur Abdelaziz Touati pour m'avoir fait l'honneur en acceptant d'examiner ma thèse et de se déplacer à Annaba pour participer à mon jury.*
- *Professeur Djamel-Eddine Benouareth pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ma thèse.*

Je tiens également à remercier individuellement :

- *Tous les membres de l'équipe de recherche de l'URMITE de Marseille, pour leur accueil et sympathie, spécialement Valérie Filosa.*
- *Tout le personnel du laboratoire de recherche du département de biochimie de l'université d'Annaba, en particulier Saida et Lazher pour leur gentillesse.*
- *Le staff du laboratoire de microbiologie du CHU d'Annaba pour leur aide précieuse.*

Sur une note plus personnelle, je tiens à remercier particulièrement mes très chers parents. Je leur exprime ma profonde gratitude pour leur soutien moral et financier ainsi que pour leurs encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur.

J'exprime également toute ma reconnaissance à mon mari pour sa patience, sa compréhension et sa collaboration dans ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à mon frère et mes sœurs pour leur complicité, à mes beaux parents et mes beaux frères pour leur encouragements, à tata Yasmina et tonton Hamadi pour leur bienveillance lors de mon passage à Marseille, et à toute la famille.

Merci à tous mes amis et collègues d'Annaba et de l'URMITE (Sofiane Bakour, Asma et Lotfi Loucif) et à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Enfin merci à ma fille, merci pour le soleil qui m'envahit quand tu me souris. Aline, cette thèse t'est dédiée!

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Partie1 : Revue de la littérature	4
Chapitre I. Etude de l'espèce <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
1-Taxonomie	4
2-Biotope	5
3-Caractères bactériologiques	5
3.1-Caractères morphologiques	5
3.2-Caractères cultureux	5
3.3-Caractères biochimiques	5
3.4- Caractères antigéniques	6
4- Facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i>	6
4.1- Antigènes de surface	7
4.2- Adhésines	8
4.3- Sidérophores.....	9
4.4- Ilot de pathogénicité	9
4.5- Élément d'intégration et de conjugaison	9
5-Pouvoir pathogène	10
6- <i>K. pneumoniae</i> et épidémies hospitalières	11
7- Méthodes de typage	12
Chapitre II. Résistance de <i>K.pneumoniae</i> aux antibiotiques	13
1-Types de résistance aux antibiotiques.....	13
1.1-Résistance naturelle.....	13
1.2-Résistance acquise.....	13
2- Supports génétiques de la résistance.....	14
2.1-Les plasmides	14
2.2-Les séquences d'insertion	14
2.3-Les éléments transposables	14
2.4- Les intégrons	14
3- Bêta-lactamines et <i>K. pneumoniae</i>	15
3.1-Mode d'action	15

3.2-Mécanismes de résistance	15
3.3-Phénotypes de résistance	17
3.4-Bêta-lactamases	19
3.5- Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	22
3.5-1- Définition des BLSE	22
3.5-2- Types des BLSE	22
3.5.3- Epidémiologie des BLSE.....	23
3.6-Les Carbapénèmases	25
4- Aminosides et <i>K. pneumoniae</i>	27
4.1- Mode d'action	27
4.2-Mécanismes de résistance	27
4.2.1-Altération de la cible.....	27
4.2.2-Modification enzymatique de l'antibiotique	29
4.2.3-Piégeage de l'antibiotique	30
4.2.4-Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique	30
4.3- Phénotypes de résistance aux aminosides	31
5-Quinolones et <i>K. pneumoniae</i>	32
5.1-Mode d'action	32
5.2-Mécanismes de résistance	32
5.3-Phénotypes de résistance aux quinolones.....	33
Partie 2 : Matériel et Méthodes	34
1-Cadre et Objectifs de l'étude.....	34
3-Isolement et identification des souches.....	35
3.1- API 20E (BioMérieux, Meylan, France) :.....	35
3.2-Spectromètre MALDI-TOF (Microflex):.....	36
3.2.1- Nettoyage de la cible (plaque métallique)	36
3.2.2- Préparation de la matrice :	37
3.2.3- Dépôt des échantillons.....	37
3.2.4- Insertion de la cible et lancement du spectromètre de masse	38
3.2.5- Lecture et interprétation des résultats	38
4-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	39
5-Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E.test	40
6-Recherche phénotypique de la production des BLSE.....	40
6.1-Milieu chromogène ESBL (Biomérieux)	40

6.2-Test de synergie.....	41
7-Recherche moléculaire des β -lactamases.....	42
7.1-L'extraction de l'ADN	42
7.2-PCR standard.....	43
7.2.1 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	48
7.3-PCR en temps réel.....	49
7.4-Séquençage.....	51
7.4.1-Analyse des séquences ADN.....	53
8-Recherche moléculaire de la résistance associée	54
8.1-Résistance aux aminosides	54
8.2-Résistance aux quinolones	54
9- Conjugaison et transfert de la résistance.....	54
10. Typage moléculaire des souches : <i>Multi-locus sequence typing</i> (MLST)	57
Partie 3 : Résultats et discussion	60
Résultats	60
1-Identification et origine des souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées.....	60
1.1-Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> dans les différents produits pathologiques.	63
1.2- Répartition des patients infectés par l'espèce <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe.....	64
1.3- Répartition des patients infectés par l'espèce <i>K. pneumoniae</i> selon l'âge.....	64
1.4-Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> dans les différents services d'hospitalisation	65
2-Biotypage	66
2.1-Biotypage des souches de <i>K.pneumoniae</i> selon les profils numériques en API 20E.....	66
2.2-Biotypage des souches de <i>K. pneumoniae</i> par MALDI-TOF :	67
3- Sensibilité aux antibiotiques	68
4- Les Phénotypes de résistance de <i>K.pneumoniae</i> aux antibiotiques	70
4.1- Phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	70
4.2- Phénotypes de résistance aux aminosides	70
4.3- Phénotypes de résistance aux quinolones.....	71
5- Recherche phénotypique des BLSE.....	72
5.1- Gélose ESBL (biomérieux)	72
5.2- Test de synergie.....	73
6-Profiles phénotypiques des souches de <i>K.pneumoniae</i> productrices de BLSE (KpBLSE).....	74
6.1- Distribution des souches KpBLSE dans les différents services d'hospitalisation	74
6.2- Distribution des souches KpBLSE dans les différents produits pathologiques	75

6.3- Corésistance des souches KpBLSE aux antibiotiques	76
6.4-Détermination des Concentration minimales inhibitrices (CMIs) des souches KpBLSE...	77
7-Profil moléculaire de la résistance aux β -lactamines des souches KpBLSE	79
7.1- PCR Standard	79
7.2- PCR en temps réel	79
7.3- Séquençage et analyse des séquences des gènes qui codent pour les BLSE.....	83
7.4-Arbres phylogénétiques.....	86
8-Recherche moléculaire de la résistance croisée	88
8.1-Résistance aux aminosides	88
8.1.1- Les enzymes modificateuses des aminosides	88
8.1.2- Les 16S ARNr méthyltransphérase.....	88
8.2- Résistance aux quinolones	92
9- Conjugaison bactérienne	96
10-Génotypage par <i>Multi-locus sequence typing</i> MLST	100
Discussion	103
Partie 4 : Conclusion et perspectives	116
Conclusion	116
Perspectives	118
Références bibliographiques	119
Résumé	136
Annexes	139

Liste des abréviations

% :	Pourcent
°C :	Le degré Celsius
µl :	Microlitre
16 S :	Svedberg (vitesse de sédimentation)
30 S :	Ribosome bactérien
A :	Adénine (base azotée)
AAC :	Aminoglycoside acetyltransferases
AAD:	Aminoglycoside adenytransferase
AARN :	Réseau National de Surveillance de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques
ACT :	Gène codant pour une céphalosporinase
ADH :	Arginine dihydrolase
ADN:	Acide desoxyribonucléique.
AME:	Aminoglycosides modifying enzymes
AmpC:	Bêta-lactamase chromosomique
ANT:	Nuclétyltransferase
APH:	Phosphotransférase
API 20E:	Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)
ARA :	Arabinose
Arm:	Aminoglycoside resistance methylase
ARN:	Acide ribonucléique
ARNr:	Acide ribonucléique ribosomique
ATP:	Adénosine Triphosphate
atpD :	β-unité F –ATPase
Azi R :	Résistant à l'azide
BES:	Brazilian Extended Spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)
BET:	Bromure d'éthidium
BGN :	Bactérie à Gram négatif
BLAST N :	Basic Local Alignment tool Nucléotide
BLAST P :	Basic Local Alignment tool Protéine
BLAST :	Basic Local Alignment tool
BLSE:	β-lactamase à spectre étendu
BMR :	Bactérie multi-résistante

C :	Cytosine (base azotée)
C+G%:	Pourcentage en guanine + cytosine du génome (coefficient de Chagraff)
C1G :	Céphalosporine de première génération
C2G:	Céphalosporine de deuxième génération
C3G:	Céphalosporine de troisième génération
C4G:	Céphalosporine de quatrième génération
CA-SFM :	Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie
CC :	Complexe clonal
CHN :	Céphalosporinase haut niveau
CHU :	Centre hospitalier universitaire
CIT :	Citrate
CMI:	Concentration minimale inhibitrice
CMY :	Cephamyacinase (gène codant pour une céphalosporinase plasmidique)
CTX-M :	Cefotaxime Munich
D:	Souche donatrice
ddntp :	Acides nucléiques modifiée
DHA :	Gène codant pour une céphalosporinase
DOS :	2-désoxys- treptamine
EARS-net :	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC :	European Centre for Disease Prevention and Control
ECP:	Electrophorèse en champ pulsé
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EMB:	Eosine bleu de méthylène
ERIC-PCR :	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase chain reaction
ESBL:	Extended spectrum beta-lactamase
EUCAST:	The European comity on antibiotic susceptibility testing
F:	Forward
FOX :	Gène codant pour une céphalosporinase
G :	Guanine (base azotée)
GEL :	Gelatinase
GES:	Guyana extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)
GLU :	Glucose
gyrA:	Gene encoding the enzyme; DNA gyrase
gyrB :	Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

H :	Heures
H2O UP :	Eau Ultra-Pure
H2S :	Hydrogen Sulfide
HCCA:	Acide- α -cyano-4-hydroxycinnamique
HPLC :	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
I :	Intermediatire
IBC :	Integron Borne Cephalosporinase
ICE :	Intégrative and Conjugative Element (élément d'intégration et de conjugaison)
IMP :	Imipéménase (carbapénémase)
Inc L/M:	Groupe d'incompatibilité du plasmide
IND :	Indole
INO :	Inositol
K:	antigène capsulaire
Kb :	Kilo bases
KpBLSE :	<i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de BLSE.
KPC :	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
L :	Litre
LART :	L'Antibio-Résistance en Tunisie
LB :	Lauria Bertani
LCR:	Liquide céphalorachidien
LDC:	Lysine décarboxylase
LEN :	Bêta-lactamse chromosomique
LPS:	Lipopolysaccharide
M:	Marqueur
MALDI-TOF:	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry
MAN :	Mannitol
MBL :	Métallo- β -lactamase
MEGA :	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MEL :	Melibiose
mg	Milligramme
MH:	Mueller Hinton
MIC:	Minimum inhibitory concentration
min :	Minute

ml :	Millilitre
MLST:	Multi-locus sequence type
MOX :	Gène codant pour une céphalosporinase
MS:	Microflex
NCBI:	Genome database of the National Center for Biotechnology Information
NDM:	New Delhi metallo- β -lactamase
NHSN:	National Healthcare Safety Network
npm:	ARNr 16S méthyltransférase
O:	Antigène somatique
ODC :	Ornithine Decarboxylase
OKP :	Bêta-lactamase chromosomique
ONPG :	L'orthonitrophényl- β -galactoside
ORL :	Oto-rhino-laryngologie
OXA-48:	Oxacillinase (carbapénémase)
<i>parC</i> :	Gene encoding the enzyme; topoisomerase IV
<i>parE</i> :	Gene encoding the enzyme; topoisomerase IV
Pb :	Paires de bases
PBN :	Pénicillinase bas niveau
PCR:	Polymerase chain reaction
PER:	<i>Pseudomonas</i> extended resistance (une bêtalactamase à spectre étendu)
PFGE:	Pulsed Field Electrophoresis Gel
PHN:	Pénicillinase de haut niveau
PLP:	Protéines de liaison aux pénicillines
PRI :	Pénicillinase résistant aux inhibiteurs
PSM:	Poste de Sécurité Microbiologique
qnr :	Quinolone resistance gene
QRDR :	Quinolone Resistance Determining Region
R :	Reverse (inverse)
RADP :	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
RHA :	Rhamnose
RM:	Réaction au rouge de Methylene
Rmt:	ARNr 16S méthyltransférase
RNA:	Ribonucleic acid
RPM :	Rotation par minute

rpoB :	Bêta-subunit of RNA polymerase
S :	Seconde
SAC :	Saccharose
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SFO :	<i>Serratia fonticola</i> (une bêtalactamase à spectre étendu)
SHV :	Sulfydryl variable
SMART :	Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends
SOR :	Sorbitol
spp :	Species (espèces)
ST :	Sequence type
subsp :	Sous-espèce
SXT :	Sulfamides + Triméthoprim
TBE :	Tris-Broat-EDTA
TC :	Transconjugant
TDA :	Tryptophan Deaminase
TEM :	Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée
TFA :	Acide TriF4lurocétique
TLA :	Tlahuicas, tribu mexicaine (une bêtalactamase à spectre étendu)
TRI :	TEM résistant aux inhibiteurs
TSAR :	La surveillance de la résistance aux antibiotiques Taïwanaise
TSB :	Trypto-caséine soja
tuf :	Gène d'élongation du facteur TU
U :	Uracile (base azotée)
UV :	Ultra-violet
V :	Volt
VEB :	Vietnam extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VIM :	Verona Imipéménase (carbapénémase)
VP :	Réaction de Voges-Proskauer
Zn⁺² :	Zinc

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i>	7
Figure 2: Distribution mondiale des géotypes de CTX-M.....	24
Figure 3 : Epidémiologie des souches <i>K. pneumoniae</i> productrices de carbapénèmases	26
Figure 4: Site-A : la région qui porte les ARNr16S méthyltransphérase.....	28
Figure 5: Distribution mondiale de la résistance aux aminosides des bactéries produisant 16S ARNr méthyltransférase qui ont été isolées.....	29
Figure 6 : Les enzymes modificatrices des aminosides	30
Figure 7 : Schéma explicatif du dépôt des disques d'antibiotiques.	42
Figure 8: Schéma explicatif de la disposition des souches sur le milieu sélectif.....	56
Figure 9: Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> dans les différents produits pathologiques	63
Figure 10: Répartition des patients infectés par l'espèce <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe	64
Figure 11: Répartition des patients infectés par l'espèce <i>K. pneumoniae</i> selon l'âge	64
Figure 12: Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> dans les différents services d'hospitalisation	65
Figure 13: Fréquence des profils numériques en API 20E des 100 souches de <i>K. pneumoniae</i> . 66	66
Figure 14: Dendrogramme des souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées aux CHU d'Annaba	67
Figure 15 : Sensibilité aux antibiotiques des 100 souches cliniques de <i>K. pneumoniae</i> aux 20 antibiotiques testés.	68
Figure 16 : Image d'antibiogramme de la souche Kp24.....	69
Figure 17: Détection de la production de β -lactamase à spectre étendu sur milieux ESBL Biomérieux.....	72
Figure 18: Images de synergie entre les C3G et l'AMC de la souche Kp1.	73
Figure 19: Détermination des CMI de la souche Kp24 par E.Test.....	78
Figure 20 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène bla_{CTX-M}	80
Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène bla_{TEM}	81
Figure 22 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène bla_{SHV}	82
Figure 23: Arbre phylogénétique du gène bla_{SHV}	86
Figure 24: Arbre phylogénétique du gène bla_{CTX-M}	87

Figure 25: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>aac(6')-Ib</i>	89
Figure 26: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>aadA</i>	90
Figure 27: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>armA</i>	91
Figure 28: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>qnrB</i>	93
Figure 29 : Culture du transconjugant sur le milieu selectif de Lauria Bertani additionné de 100µg/ml Amikacine, 16µg/ml céfotaxime et 200 µg/ml azide	96
Figure 30: Images des antibiogrammes des trois souches, montrant le transfert des déterminants de la résistance par un plasmide transconjugant.	98
Figure 31: Image des CMI par E.Test de la céfotaxime et la gentmicine du transconjugant.	99
Figure 32: PCR des 5 souches d' <i>E. coli</i> transconjugants. (I) amplification du gène CTX-M par PCR standard, (II) amplification du gène <i>armA</i> par PCR standard.	99
Figure 33: Arbre phylogénétique, des 23 souches de <i>K. pneumoniae</i> productrices du gène <i>armA</i> , déduit de l'analyse MLST et montrant le clone ST39.	102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre <i>Klebsiella</i>	6
Tableau 2: Phénotypes de résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux bêta-lactamines	19
Tableau 3: Classification des β -lactamases d'après Bush-Jacoby-Medeiros	21
Tableau 4: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux aminosides	31
Tableau 5: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones	33
Tableau 6: Traduction des profils numériques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en caractères biochimiques	36
Tableau 7: Antibiotiques testés	39
Tableau 8: Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards	44
Tableau 9: Amorces utilisées pour les PCR standard et le séquençage	46
Tableau 10: Composition du mélange réactionnel pour la PCR en temps réel	49
Tableau 11: Amorces et sonde fluorescente utilisées pour la PCR en temps réel	50
Tableau 12: Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye	52
Tableau 13: Caractéristiques des 7 gènes utilisés en MLST.....	58
Tableau 14: Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage	59
Tableau 15: Provenance des 100 souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées et leurs scores MALDI-TOF.	61
Tableau 16: Fréquences des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches de <i>K. pneumoniae</i> étudiées	70
Tableau 17: Fréquences des phénotypes de résistance aux aminosides des souches de <i>K. pneumoniae</i> étudiées.	71
Tableau 18: Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones des souches de <i>K. pneumoniae</i> étudiées	71
Tableau 19: Nombre et pourcentage des souches KpBLSE dans les différents services d'hospitalisation	74
Tableau 20: Nombre et pourcentage des souches KpBLSE dans différents produits pathologiques	75
Tableau 21: Nombre et pourcentage des de corésistance des souches KpBLSE aux antibiotiques	76
Tableau 22: Profil moléculaire des 80 souches KpBLSE.....	84
Tableau 23: Profil moléculaire de la résistance associée des 80 souches KpBLSE aux aminosides et aux quinolones.....	94

Tableau 24: Profil de résistance des 5 souches donatrices *K. pneumoniae* et les 5 souches d'*Eschericia coli* transconjugants 97

Tableau 25: Génotypage des 23 souches *K. pneumoniae* productrices du gène armA par MLST: Profil des allèles et leurs sequence type (ST)..... 101

Introduction

La découverte des antibiotiques a permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses au cours du 20^{ème} siècle. Cependant, leur utilisation massive et répétée a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à ces médicaments.

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, particulièrement *Klebsiella pneumoniae*, représente un problème majeur de santé publique. Les infections nosocomiales causées par ces bactéries multirésistantes conduisent à l'augmentation des coûts des soins, à des hospitalisations prolongées, à des échecs thérapeutiques et à un taux élevé de morbidité et de mortalité (185).

K. pneumoniae est un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans des infections sévères notamment des infections urinaires, de pneumonies et de bactériémies (20). De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, comme les diabétiques et les alcooliques. Elle peut se propager rapidement entre les patients hospitalisés surtout dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (131).

K. pneumoniae est l'espèce d'entérobactérie qui a démontré ses particularités d'acquisition de plasmide exprimant des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) dont la dissémination fut amorcée par l'utilisation massive de céphalosporines à large spectre en milieu hospitalier. Aujourd'hui ces enzymes sont détectés chez d'autres espèces d'entérobactéries (41).

Au début des années 1980, la première BLSE plasmidique, dérivant de la pénicillinase SHV-1, fut identifiée en Allemagne dans une souche de *K. pneumoniae*. Jusqu'à la fin des années 1990, les BLSE étaient principalement identifiées dans des souches de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier. Ces BLSE dérivait des pénicillinases à spectre restreint TEM et SHV. Depuis 1995, les BLSE de type CTX-M en particulier le gène CTX-M-15 ont émergé de chez les entérobactéries. Dès lors, la situation épidémiologique a complètement changé dans le monde (41). En Algérie, la première détection d'une souche de *K.pneumoniae* produisant le gène CTX-M-15 était en 2005 à l'hôpital de Bejaia (206).

Les aminosides sont souvent utilisés en synergie avec les β -lactamines pour traiter des infections graves causées par les bactéries à Gram négatif. La résistance aux aminosides a été attribuée principalement à une inactivation enzymatique par les enzymes modificateuses des aminosides (AMEs). La méthylation de l'ARN ribosomique 16S (ARNr) a récemment émergé parmi les

pathogènes à Gram négatif comme un nouveau mécanisme de résistance. Ce dernier confère la résistance de haut niveau à tous les aminosides cliniquement pertinents (210).

Les gènes codant pour ces méthyltransférases sont généralement situés sur des plasmides transférables codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, ils peuvent donc coexister avec des BLSE, qnr, AmpC contribuant à un phénotype multirésistant aux antibiotiques (99). Ce qui conditionne leur grand pouvoir de dissémination entre différentes souches bactériennes, de même espèce ou d'espèces différentes, grâce à divers mécanismes de transferts génétiques telle que la conjugaison bactérienne.

Cette tendance à la hausse de la résistance combinée signifie que pour les patients qui sont infectés par ces bactéries multirésistantes aux antibiotiques « BMR » seules quelques options thérapeutiques restent disponibles, parmi ceux-ci, les carbapénèmes, une classe d'antibiotiques de dernier recours bien que plusieurs gènes codant pour les carbapénémases ont été décrits chez l'espèce de *K. pneumoniae* (152). Récemment, un nouveau type de carbapénémase plasmidique a été découvert chez une espèce de *K. pneumoniae* en 2008, la New Delhi métallo- β -lactamase 1 (NDM-1), chez des patients qui reviennent du sous-continent indien (216). Ce gène, qui s'est diffusé dans plusieurs types de bactéries à travers le monde, est devenu la préoccupation actuelle des scientifiques car il ne laisse plus d'alternatives thérapeutiques possibles.

La propagation internationale des BMR nécessite une stratégie commune et justifie une surveillance spécifique impliquant des ressources financières et intellectuelles importantes.

Pour cela, il est essentiel de comprendre les mécanismes génétiques impliqués, mais également de mettre en place des mesures d'hygiène adaptées à ces situations afin de prévenir, et le cas échéant, de stopper les transmissions de ces bactéries dans nos hôpitaux.

Cependant, l'épidémiologie des infections à *K. pneumoniae* « BMR » est parfois complexe : en effet, la dissémination de la résistance peut être liée à la diffusion de souches, de plasmides, ou d'autres gènes de résistance. Afin d'analyser l'épidémiologie de ces souches, plusieurs marqueurs phénotypiques et surtout génotypiques peuvent être utilisés.

Les objectifs de cette étude étaient de mettre en évidence la prévalence et la diversité génétique des souches de *K. pneumoniae* « BMR » isolées aux niveaux des hôpitaux de la ville d'Annaba, d'identifier le support génétique de cette résistance, d'étudier les possibilités de transfert des gènes de résistances et la relation clonale entre les souches. Pour cela, nous avons eu recours a

diverses techniques de Biologie Moléculaire, telles que la PCR, le séquençage, la conjugaison bactérienne ainsi qu'au *multi-locus sequence typing* (MLST).

Ce manuscrit s'articule autour de 4 parties :

La première partie portera principalement sur la revue de la littérature concernant l'étude bactériologique de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, les différents mécanismes et les données épidémiologiques de sa résistance aux antibiotiques. La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisées. La troisième partie portera sur l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une quatrième partie qui sera consacrée à la conclusion et les perspectives de recherche à venir.

Partie1 : Revue de la littérature

Chapitre I. Etude de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*

1-Taxonomie

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19^{ème} siècle. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, connue autre fois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie (81).

Le genre *Klebsiella* appartient à la tribu des *Klebsielleae*, la famille des *Enterbacteriaceae*, l'ordre *Enterobacteriales*, la classe *Gamma Proteobacteria*, le phylum *Proteobacteria*, et le domaine des *Bacteria* (30).

La position taxonomique du genre *Klebsiella* est discutée car de nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre sur des arguments phénotypiques sans réévaluation globale de la position taxonomique du genre parmi les entérobactéries, ni des différences d'espèces entre elles (80). L'analyse de séquences de gènes universels 16S *rARN* et *rpoB* (gène codant la sous-unité b de l'ARN polymérase) a amené à proposer un remembrement en deux genres distincts et des modifications de nomenclature avec la création du genre *Raoultella* (71). La validité de ce genre a été récemment confirmée par analyse de la séquence des gènes *tuf* et *atpD* (155). Le genre *Raoultella* comporte trois espèces, *R. ornithinolytica*, *R. terrigena* et *R. planticola* (9,71). Cette dernière espèce regroupe l'ensemble des souches précédemment décrites dans l'espèce *K. trevisanii* (82)

Les anciennes espèces taxonomiques *K. rhinoscleromatis* et *K. ozaenae* sont des sous-espèces de *K. pneumoniae* et l'analyse *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) montrent qu'elles représentent des clones au sein de l'espèce *K. pneumoniae* (32).

Actuellement, le genre *Klebsiella* comporte deux espèces principales: *K. oxytoca* et *K. pneumoniae* subdivisée en 3 sous-espèces : *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*, *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae* (71).

Enfin, s'ajoutent *K. granulomatis* agent de la donovanose, ainsi qu'un taxon récemment individualisé qui est la *K. variicola* (10,181).

2-Biotope

K. pneumoniae subsp. pneumoniae est une espèce isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux (119), et de muqueuses des mammifères, en particulier de la flore fécale (9,31). Chez l'homme, cette espèce végète sur la peau, les muqueuses, les voies respiratoires supérieures et elle est isolée des selles chez 30 % des individus. Pour ce qui est des infections nosocomiales, le tube digestif des patients hospitalisés et les mains du personnel sont les deux sources principales (94). Les deux sous-espèces *K. pneumoniae subsp. ozaenae* et *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* n'ont été isolées qu'en situation pathogène de l'arbre respiratoire de l'homme (71).

3-Caractères bactériologiques

3.1-Caractères morphologiques

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif de 0.5 µm sur 3 µm environ, à extrémités arrondies, se présentant de manière isolée, groupés en diplobacilles ou en courtes chaînettes souvent enrobés dans la même capsule. Cette bactérie se distingue par son immobilité constante, elle est asporogène, capsulée mais cette dernière peut être absente chez 5% des souches (121) .

3.2-Caractères cultureux

K.pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose. Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, EMB) après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37 °C, les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (121),(81) .

En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37 °C pour *K. pneumoniae* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface. À la différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90% des souches de *K. pneumoniae* croissent à 44 °C en bouillon lactosé bilié vert brillant et plus de 80% en fermentant le lactose avec production de gaz (121).

3.3-Caractères biochimiques

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive (121). L'identification phénotypique du genre *Klebsiella* repose essentiellement sur Les caractères biochimiques différentiels illustrés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre *Klebsiella* (80).

Test	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>
	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>	
Indole	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-
LDC	V	+	-	+
VP	-	+	-	+

V : variable.

3.4- Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité :

- Antigènes « O » somatiques : la recherche des antigènes « O » présente peu d'intérêt pratique, en raison de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires
- Antigènes « K » capsulaires : au moins 77 antigènes K ont été décrites chez *K. pneumoniae*, K1 à K72, K74, K79 à K82. Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent aux types capsulaires 1 et 2, plus rarement 3 et 4.
- Antigène d'adhérence : appelé fimbriae, de nature protéique, porté par des pili communs (81,121).

4- Facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae*

Les termes facteurs de pathogénicité et facteurs de virulence sont souvent utilisés comme synonymes. Mais certains auteurs font une distinction claire entre les deux : le terme pathogénicité définit la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que la virulence est la mesure ou le degré de pathogénicité (164). Cinq types de facteurs sont présentés dans la figure 1.

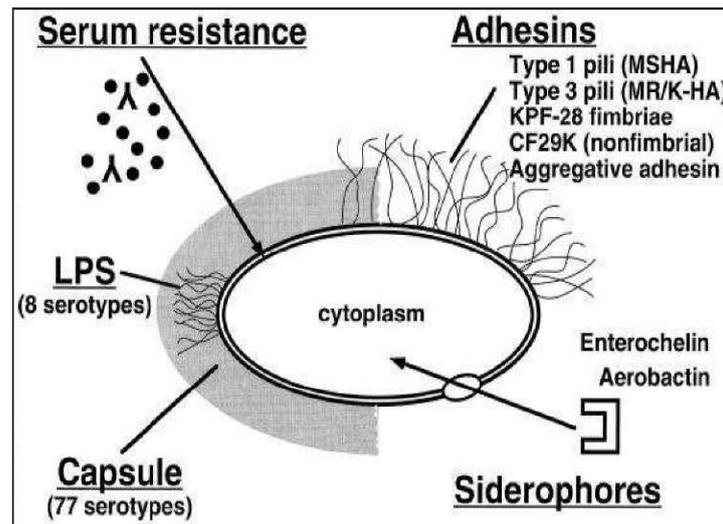


Figure 1: Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* (164).

4.1- Antigènes de surface

Deux types d'antigènes sont exprimés à la surface de *K. pneumoniae*. Ces deux antigènes contribuent à la pathogénie de cette bactérie. Le premier est l'antigène "O" qui est le composant du liposaccharide (LPS) et dont 9 types ont été identifiés. Le second est l'antigène capsulaire (K), un polysaccharide capsulaire dont 82 ont été décrits et 77 caractérisés.

- **Le lipopolysaccharide (LPS)**

Le LPS, est formé de plusieurs composés : le lipide A de structure oligosaccharidique, et l'antigène "O". L'antigène "O", composé le plus externe du LPS, est formé d'unités répétées de polymères d'oligosaccharides. Le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique. Le rôle principal du LPS *in vivo* est de protéger *K. pneumoniae* du pouvoir bactéricide du sérum (55).

- **La capsule**

La majorité des souches de *K. pneumoniae* produit une capsule de nature polysaccharidique ; elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique. Sur les 82 antigènes capsulaires, 77 constituent une base de reconnaissance internationale. La capsule est essentielle à la virulence des Klebsielles (51),(70),(100). Elle forme d'épais faisceaux de

structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne en couche épaisse et dense (2) qui protège la bactérie de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles, d'une part (162), (163), (163), (191), (192) et de l'effet bactéricide de facteurs sériques d'autre part (212). Toutefois, en termes de pathogénicité, il existe des différences importantes en fonction des sérotypes capsulaires. Plusieurs modèles d'infections expérimentales ont permis de mettre en évidence ces différences. Les souches exprimant les antigènes capsulaires K1 et K2 sont particulièrement virulentes dans un modèle murin de péritonite comparées à d'autres sérotypes qui sont peu ou pas virulents (8), (140). Dans les lésions cutanées induites expérimentalement chez la souris, les souches de sérotypes K1, K2, K4, K5 se sont révélés les plus virulentes (193). En pathologie humaine, même si les données sont parcellaires, les souches de sérotype K1 et K2, sont actuellement, considérées comme les plus virulentes. Bien qu'il n'existe pas de corrélation entre sérotypes et sites d'infection, plusieurs études suggèrent l'implication du sérotype K2 dans les infections urinaires, pulmonaires ou les bactériémies.

De plus, le sérotype K2 est retrouvé essentiellement dans les souches humaines et très rarement dans l'environnement(34), (75), (133), (161). Les souches de sérotype K1 ont été depuis les années 80 associées au syndrome clinique associant un abcès primitif du foie et des complications métastatiques (endophtalmie, méningite) largement décrit en Asie (159), (78). Les souches isolées de ces infections sont le plus souvent hypermuqueuses et deux gènes impliqués dans la synthèse de la capsule ont été proposés comme facteurs de virulence.

4.2- Adhésines

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Le terme d'adhésine est utilisé pour la dénomination de molécules variées impliquées dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux (55). Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Ce sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes.

Ils sont formés de différentes sous-unités. Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3.

- Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils ont la plus grande capacité d'adhésion. Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (199).

- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins bien connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Leur rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections (urinaire, pulmonaire). Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde (186).

4.3- Sidérophores

C'est la possibilité qu'ont les bactéries de capter le fer environnant grâce à des structures particulières, les sidérophores. Dans l'organisme de l'hôte, le fer n'est pas à l'état libre mais associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection (55).

4.4- Îlot de pathogénicité

C'est un grand fragment chromosomique d'ADN (35 - 45 kb) ; il porte les gènes de virulence, en particulier le locus de la yersiniabactine indispensable à l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia sp.*; il s'insère au niveau de la terminaison 3' du gène de l'ARN de transfert; (iii) le taux de G+C% est différent de celui du reste du chromosome et il est flanqué de séquences répétées (39). Cet îlot contient de nombreux gènes dont le locus de la yersiniabactine: sa fonction essentielle est de capter des molécules de fer essentielles à la croissance et à la dissémination de la bactérie.

4.5- Élément d'intégration et de conjugaison (ICE : Intégrative and Conjugative Element)

Le transfert horizontal de gènes, intra-espèces et inter-espèces, joue un rôle essentiel dans l'évolution et la capacité d'adaptation des bactéries (60),(106). Trois mécanismes principaux, la transformation, la transduction et la conjugaison (58) permettent à des populations bactériennes d'acquérir des gènes par transfert horizontal de répondre ainsi rapidement aux défis et stress environnementaux (91).

5-Pouvoir pathogène

K. pneumoniae subsp. pneumoniae est un pathogène opportuniste responsable d'infections communautaires et d'infections nosocomiales. Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections bronchopulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosantes, les abcès pulmonaires, les pleurésies purulentes (40) . Cette espèce est également responsable d'infections intra-abdominales et est isolée de mal perforant plantaire.

K. pneumoniae subsp. pneumoniae est surtout actuellement un agent d'infections nosocomiales (164), responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies (86) de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales.

K. pneumoniae subsp. ozaenae est responsable d'une rhinite chronique atrophique décrite sous le nom d'ozène. Cette infection se manifeste par une ulcération chronique de la muqueuse nasale pouvant aboutir à une perforation du cartilage nasal, accompagnée de décharges nasales purulentes et nauséabondes (80). *K. pneumoniae subsp. ozaenae* a été également isolée à partir de surinfections de bronchite chronique (135), de bactériémies (125), de méningites (203), d'abcès cérébraux d'otites, de mastoïdites, d'infections urinaires, de surinfections de plaies et d'ulcères de la cornée (198).

K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis est responsable du rhinosclérome, infection granulomateuse chronique des voies aériennes supérieures, dont quelques cas ont été rapportés chez des patients infectés par le VIH (198). Un cas de septicémie a été rapporté (168).

K. pneumoniae occupe une place importante dans la pathologie infectieuse du nouveau-né. En effet, les infections nosocomiales à *K. pneumoniae* dans les services de néonatalogie sont fréquentes, notamment dans les unités de soins intensifs et chez les prématurés (17).

Enfin, depuis les années 1980, *K. pneumoniae* a émergé comme agent d'abcès hépatiques primitifs survenant dans la communauté chez des patients sans antécédents de pathologie hépatobiliaire (159). Ce syndrome, associé à une bactériémie et éventuellement des complications métastatiques (endophtalmie, méningite ...), a été essentiellement décrit en Asie (44),(78). Plus récemment, des cas ont été rapportés en Amérique du Nord et en Europe (100), (209),(79), (63), souvent chez patients d'origine asiatique, suggérant une susceptibilité génétique à cette infection. Dans la majorité des cas, les souches à l'origine de ce syndrome appartiennent au sérotype capsulaire K1 et au complexe clonal ST23 (209).

6- *K. pneumoniae* et épidémies hospitalières

K. pneumoniae est la principale espèce bactérienne responsable d'épidémies intra-hospitalières surtout en service de pédiatrie et de soin intensif. Depuis 2010, nous avons analysé plus de 150 publications descriptives référencées dans PubMed en tapant les mots clés « *Klebsiella pneumoniae and nosocomial outbreak(s)* ». Toutes ces publications relatent des épidémies dues à des souches multirésistantes et productrices des nouvelles β -lactamases. Les pays concernés sont répartis sur les 5 continents avec une faible représentation des pays en voie de développement, en raison de l'insuffisance des moyens humains, techniques et biologiques pour publier dans des revues internationales. Les pays les plus concernés par ces problèmes sont : les Etats Unis (n = 11 publications), la Grèce (n=10), Espagne (n=11), Amérique du sud (n=25), Italie (n=8), la France (n=23), Israël (n=5), Chine (n=5), Afrique (n=8). En Algérie deux publications étaient rapportées (y compris notre étude) (15),(20). Le nombre de cas rapportés par épidémie varie de 2 à 161. Dans 25% des cas les services concernés sont des unités de soins intensifs adultes ou de néonatalogie.

Les principales β -lactamases associées à ces clones épidémiques sont essentiellement des carbapénémases (n =75) (NDM-1, KPC, VIM, OXA-48), des β - lactamases à spectre étendu (n=111) (CTX-M-15, SHV-12), des AmpC (n=5) (DHA). Certains clones définis par *Multi-locus sequence Typing* (MLST) ont été rapportés associés à certaines β -lactamases, en particulier, ST258 (Sequence Type) et KPC-3, complexe clonal (CC) ST11, ST15, ST47 et CTX-M-15, ST101, ST395 et OXA-48.

Quatre enquêtes nationales ont rapporté la diffusion de clones épidémiques (i) en Hongrie avec un clone produisant CTX-M-15 (196 cas dans 41 hôpitaux), (ii) en Grèce avec un clone produisant VIM-1 (40 hôpitaux, 20% des isolats de *K. pneumoniae*), (iii) en Grèce avec un clone produisant KPC-2 (166 cas dans 44 hôpitaux), (iv) en Israël avec un clone produisant KPC-3 (1275 cas dans 27 hôpitaux).

Le contrôle des infections nosocomiales à *K. pneumoniae* repose d'une part, sur la maîtrise de leur transmission (respect de mesures d'hygiène classiques, lavage des mains, isolement, respect des protocoles de soins des cathéters urinaires et veineux, des trachéotomies, des plaies et de l'équipement hospitalier) (34), d'autre part, sur la maîtrise de la prescription des antibiotiques. Mais ce contrôle ne peut être efficace sans une connaissance approfondie des capacités de virulence et de transmissibilité des différents isolats à l'intérieur de l'espèce *K. pneumoniae*.

7- Méthodes de typage

Le typage est souvent nécessaire pour déterminer la clonalité des souches. Cela est particulièrement important dans les foyers endémiques et épidémiques à *K. pneumoniae* pour améliorer la gestion de ces épidémies.

Du point de vue épidémiologique, différentes méthodes ont été proposées pour comparer les souches de *K. pneumoniae*. Parmi les méthodes phénotypiques, le sérotypage, basé sur la détermination de l'antigène capsulaire K, est difficilement applicable : 77 sérotypes capsulaires sont actuellement reconnus. Une méthode par PCR-RFLP a été décrite (33).

Parmi les méthodes moléculaires, le ribotypage est très discriminant pour les isolats de *K. pneumoniae*. L'électrophorèse en champ pulsé est une technique de référence, reproductible et discriminante mais relativement longue. Les techniques d'amplification aléatoire (RAPD, ERIC-PCR) sont faciles à mettre en œuvre mais moins discriminantes ; elles peuvent être néanmoins adaptées à l'épidémiologie locale (62).

Enfin, le MLST (*multi-locus sequence typing*) qui consiste à amplifier et séquencer plusieurs gènes de ménage, est reproductible et permet de comparer des souches entre laboratoires. Le schéma MLST, développé par *Diacourt et al.*, basé sur 7 gènes, est actuellement le plus utilisé (66). Il a permis, notamment, de mettre en évidence la diffusion du clone ST23 dans les abcès hépatiques émergents. Le travail récent de *Brisse et al.* a montré l'existence de complexes clonaux associés à un pouvoir pathogène particulier, par exemple CC23^{K1} et CC82^{K2} (32). Par ailleurs, le typage MLST est largement utilisé dans les études de clonalité des souches multi-résistantes disséminant à l'échelle mondiale. Ainsi, certains clones producteurs de CTX-M-15 comme les clones ST11 et ST15 semblent avoir un haut potentiel épidémique. Il en est de même pour le clone ST258 et ST39.

Chapitre II. Résistance de *K. pneumoniae* aux antibiotiques

1-Types de résistance aux antibiotiques

L'efficacité de l'antibiotique dépend d'au moins trois facteurs : la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, et donc présents chez toutes les souches de l'espèce, soit d'une résistance acquise par certaines souches, suite à l'apparition de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de matériel génétique tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons.

D'après le Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie : « les souches catégorisées résistantes sont celles pour lesquelles il existe une probabilité d'échec thérapeutique, quels que soient les traitements et la dose d'antibiotique » (48) .

1.1-Résistance naturelle

K. pneumoniae possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique (avec plusieurs variants SHV, LEN, OKP) qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines (amino-, carboxy- et uréido- pénicillines). Cette pénicillinase est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam). Ainsi, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes (49).

Concernant les autres antibiotiques, *K. pneumoniae* est sensible aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la fosfomycine et au cotrimoxazole.

1.2-Résistance acquise

K. pneumoniae a toujours joué un rôle majeur dans l'apparition et/ou la dissémination des mécanismes de résistance, en particulier vis-à-vis des β -lactamines. Ainsi, dans les années 1970, ces bactéries ont été pionnières pour les résistances aux aminosides (45). A partir des années 1980, *K. pneumoniae* a largement contribué à la dissémination hospitalière des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui leur confèrent une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (158),(195). Plus récemment, cette espèce occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux carbapénèmes (KPC, OXA-48). Lorsque l'on fait un bilan des nouvelles β -lactamases décrites depuis 1983, *K.*

pneumoniae est dans 80% des cas l'hôte chez qui ont été découvertes ces nouvelles enzymes (de type TEM, SHV ou de la classe C) (158). Lorsqu'elle n'est pas le premier hôte, on retrouve très fréquemment cette espèce comme responsable de la diffusion épidémique de nouvelles enzymes comme les métallo-enzymes de type VIM et NDM-1 (112,213).

2- Supports génétiques de la résistance

Les entérobactéries sont particulièrement efficaces pour échanger de l'information génétique et la résistance aux antibiotiques de ces espèces est souvent due à l'acquisition de gènes étrangers. Ces gènes ont été capturés à partir du chromosome d'espèces différentes. Ces mobilisations impliquent deux types différents d'éléments génétiques mobiles. Ceux qui sont capables de transférer ou de capter des gènes entre les molécules d'ADN tels d'insertion, les transposons, ou les cassettes des intégrons, et ceux qui permettent de transfert d'ADN entre cellules, tels que les plasmides conjugatifs et mobilisables ou les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) (194).

2.1-Les plasmides : sont des agents essentiels pour le flux horizontal de gènes et donc une composante importante de l'évolution bactérienne. Ce sont des ADN circulaires extra-chromosomiques capables d'autoréplication et parfois de transfert. Les plasmides codent également pour des fonctions conférant un avantage à la cellule hôte comme leur capacité à porter et à transmettre les gènes codant pour la résistance aux antimicrobiens.

2.2-Les séquences d'insertion : sont la forme la plus simple d'un élément transposable. Elles sont composées uniquement d'un gène de transposase bordé de part et d'autre d'une séquence inversée répétée. Les séquences d'insertion sont très impliquées dans le recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques.

2.3-Les éléments transposables : forment une classe très hétérogène d'éléments génétiques pouvant s'insérer par transposition à divers endroits sur un chromosome ou un plasmide. Ces éléments mobiles portent les gènes codant pour les fonctions de transposition qui sont généralement associés à des gènes supplémentaires qui peuvent être des gènes de résistance aux antibiotiques.

2.4- Les intégrons : sont des systèmes de recombinaison spécifiques de site permettant de réorganiser des gènes sous forme de cassettes mobilisables par l'action d'une intégrase. Depuis leur découverte dans les années 1980, ils se sont avérés être les vecteurs d'expression naturels les plus complexes concernant la réorganisation des gènes de résistance aux antibiotiques.

3- Bêta-lactamines et *K. pneumoniae*

Les bêta-lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections causées par les *K. pneumoniae* vue leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action. Elles comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes, et ont toutes en commun le cycle β -lactame (35).

3.1-Mode d'action

L'enveloppe de *K. pneumoniae* comprend, de l'extérieur vers l'intérieur, la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique. Les cibles des β -lactamines sont situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique. La membrane externe représente la seule barrière de perméabilité importante pour la pénétration des β -lactamines. Les molécules utilisées vis-à-vis des *K. pneumoniae* sont pour la plupart des β -lactamines hydrophiles qui ne peuvent pas diffuser de façon significative au travers de la membrane externe des entérobactéries qui est riche en acides gras saturés. Elles empruntent principalement la voie des porines pour franchir la membrane externe (150).

Les cibles des β -lactamines sont des protéines membranaires appelées « protéines de liaison aux pénicillines » (PLP) (197). Les β -lactamines présentent une analogie structurale avec le dipeptide qui constitue le substrat naturel des PLP. Elles se comportent comme des 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 sérine active de la poche catalytique des PLP. L'effet d'une β -lactamine dépend de son affinité pour les différentes PLP. Les β -lactamines ont en revanche peu d'affinité pour les PLP de bas poids moléculaire. L'inhibition des PLP induit un arrêt de la synthèse du peptidoglycane et de la croissance bactérienne (49).

L'effet bactéricide des β -lactamines résulte de phénomènes secondaires mal compris déclenchés par l'inhibition des PLP. Il est initié par une altération du peptidoglycane qui induirait une activation dérégulée d'autolysines pariétales (muréine hydrolase et endopeptidase) conduisant à la lyse bactérienne (49).

3.2-Mécanismes de résistance

La résistance naturelle ou acquise aux β -lactamines est caractérisée par au moins quatre mécanismes qui peuvent par ailleurs être combinés : l'imperméabilité de la membrane externe, l'expression d'une pompe d'efflux actif, la modification d'affinité de la cible (PLP) et enfin

l'inactivation enzymatique par les β -lactamases, constituant le mécanisme principal de la résistance naturelle et acquise des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines (49).

▪ **Imperméabilité**

La membrane externe de *K. pneumoniae* est formée entre autre de lipopolysaccharide (LPS) dont la structure est hydrophile grâce à ses charges électriques de surface et très compacte en profondeur grâce à ses acides gras insaturés. Cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicillines G, V et M, macrolides, rifampicine, acide fusidique et glycopeptides) (149).

Les porines permettent des échanges par diffusion passive de nutriments et d'autres substances entre le périplasme et le milieu extérieur. Les β -lactamines hydrophiles peuvent également traverser la membrane externe en empruntant les porines *OmpK36*, *OmpD* et *Omp36* chez *K. pneumoniae* (49). Cependant, des résistances acquises par diminution de la perméabilité de paroi ont été rapportées chez cette espèce suite à une altération quantitative ou qualitative des porines. Ce mécanisme de résistance s'exprime généralement à bas niveau, peut toucher de multiples familles d'antibiotiques et est souvent associé à d'autres mécanismes de résistance : efflux et/ou production de β -lactamase.

▪ **Excrétion par des systèmes d'efflux**

Les systèmes d'efflux sont constitués chez *K. pneumoniae* de trois protéines (149):

- Une, insérée dans la membrane cytoplasmique jouant le rôle de pompe,
- Une seconde, insérée dans la membrane externe assurant le passage au travers de la membrane externe,
- Une troisième, périplasmique, qui formerait un lien entre la pompe et la protéine de membrane externe.

Ces systèmes sont en fait des pompes métaboliques assurant l'expulsion active des produits du métabolisme ou de toxiques, comme les antibiotiques, en utilisant une force protomotrice. 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 systèmes de multirésistance.

▪ **Modification de PLP**

Plusieurs facteurs peuvent concourir à la résistance par modification de la cible : perte d'affinité des PLP pour les β -lactamines par mutation, acquisition de gènes ou fragments de gènes codant pour des PLP d'affinité diminuée ou hyperproduction de PLP normales. Ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez *K. pneumoniae* (149).

▪ **B-lactamases**

La production d'enzymes inactivatrices est le principal mécanisme de résistance de *K. pneumoniae* aux β -lactamines. Le processus enzymatique repose sur un résidu sérine actif chez les enzymes les plus fréquentes ou sur un ion métallique Zn^{2+} . Dans les deux cas, l'inactivation des β -lactamines est due à l'ouverture du cycle β -lactame au niveau de la liaison amide, selon une réaction d'hydrolyse suite à l'activation d'une molécule d'eau.

3.3-Phénotypes de résistance

Pour chaque espèce, on distingue un phénotype sauvage de résistance aux β -lactamines ou « phénotype sensible » et des phénotypes de résistance acquise ou « phénotypes résistants. La connaissance des phénotypes de résistance permet :

- d'établir la liste des β -lactamines à étudier en routine,
- de contrôler la cohérence entre l'identification et le phénotype de résistance,
- de pallier les imperfections des tests de sensibilité *in vitro* par l'application de règles de lecture interprétative,
- de guider le choix thérapeutique.

Les phénotypes de résistance aux β -lactamines de *K. pneumoniae* sont illustrés dans le tableau 2.

▪ **Phénotype sauvage «penicillinase bas niveau »**

K. pneumoniae produit naturellement et d'une façon constitutive des enzymes chromosomiques de classe A sensible aux inhibiteurs (SHV-1 et LEN-1). Elles confèrent une résistance patente aux aminopénicillines (ex. Ampicilline) et aux carboypénicillines (ex. Ticarcilline) et souvent inapparente aux uréidopénicillines (ex. Pipéracilline). Ce phénotype de résistance appelé «pénicillinase de bas niveau », se caractérise par la persistance d'un diamètre d'inhibition autour de ces disques). L'association pénicilline-inhibiteurs sont actives.

- **Phénotype « pénicillinase haut niveau »**

Ce phénotype de résistance se présente chez *K. pneumoniae* sous forme d'une activité pénicillinase forte responsable d'une résistance aux aminopénicillines, à leur association aux inhibiteurs, aux carboxypénicillines et aux uréidopénicilline et aux céphalosporine de première génération (C1G) (ex. Céfalotine). Une diminution de la sensibilité est communément observée pour les associations ticarcilline-clavulanate et pipéracilline-tazobactam. La résistance peut également s'étendre aux C2G.

- **Phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs »**

Ce phénotype comporte une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et à moindre niveau aux uréidopénicilline. Cependant, il s'en distingue par une résistance aux associations des aminopénicillines et des carboxypénicillines avec les β -lactamines inhibitrices alors que les C1G conservent généralement leur efficacité.

- **Phénotype « β - lactamase à spectre étendu (BLSE) »**

Ce phénotype comprend une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines à l'exception des carbapénèmes (ex. Imipénème) et céphamycines (ex. Céfoxitine). Cependant, la résistance aux C3G, C4G et aux monobactames (ex. Aztreonam) est plus ou moins marquée selon les enzymes et les souches (CMI de <1 à 128 mg/L). En règle générale, cette résistance est apparente pour au moins une de ces molécules. La plupart des BLSE sont plus sensibles aux β -lactamines inhibitrices que les pénicillinases à large spectre TEM-1 et SHV-1. L'efficacité des associations pénicillines - β -lactamines inhibitrices n'est donc pas constante, car dépendante du type enzymatique et de son niveau de production. Cependant, la sensibilité aux β -lactamines inhibitrices reste généralement suffisante pour être à la base de la détection de ce phénotype qui repose sur la mise en évidence d'une image de synergie entre les inhibiteurs et les C3G et/ou les C4G et/ou l'aztréonam.

- **Phénotype « céphalosporinase haut niveau »**

Ce phénotype correspond à une résistance plus ou moins marquée aux pénicillines, aux C1 G, aux C2G, à l'aztréonam et à au moins une C3G. Cette résistance peut résulter de l'acquisition d'un gène *ampC* plasmidique (ex. : CMY, FOX, MOX, ACT, DHA...) (22). Mobilisés par transposition, les gènes *ampC* ont migré du chromosome des espèces naturellement productrices d'AmpC sur des plasmides souvent conjugatifs qui peuvent ensuite diffuser au sein des entérobactéries tel que *K. pneumoniae*. Le test de synergie est négatif entre les C3G, les C4G ou

l'aztréonam et les β -lactamines inhibitrices. Les céphamycines ne sont pas actives et les C4G restent le plus souvent efficaces.

- **Autres phénotypes de résistance**

K. pneumoniae présente une diminution de sensibilité aux céphamycines, aux C1 G, C2G et parfois aux C3G à moindre degré. Ce phénotype est lié à un déficit en porine qui engendre par ailleurs une diminution de sensibilité ou une résistance aux quinolones, chloramphénicol.

Tableau 2: Phénotypes de résistance de *K. pneumoniae* aux bêta-lactamines (49)

Antibiotiques	Phénotypes de résistance				
	Sauvage	PHN	PRI	BLSE	CHN
Aminopénicillines	R	R	R	R	R
Aminopénicillines+ Acide clavulanique	S	S/I/R	R	S/I/R	R
Carboxypénicillines	R	R	R	R	R (I)
Carboxypénicillines+Acide clavulanique	S	S/I (R)	R	S/I/R	R (I)
Uréidopénicillines	(S→I)	I/R	I/R	R	R (I)
Uréidopénicillines+ tazobactam	S	S/I	S I/I (R)	S/I (R)	R/I (S→I)
Céphalosporines de première génération	S	S/I/R	S	R	R
Céphalosporines de deuxième génération	S	S (I)	S	R	R/I (S→I)
Céphamycine	S	S	S	S	R/I
Céphalosporines detroisième génération	S	S	S	R/I/(S→I)	R/I (S→I)
Céphalosporines de quatrième génération	S	S	S	R/I/(S→I)	S
Carbapénèmes	S	S	S	S	S

La flèche indique les interprétations préconisées. S : sensible, I : sensibilité intermédiaire, R : résistant, PHN : pénicillinase haut niveau, PRI : pénicillinase résistant aux inhibiteurs, BLSE : bêtalactamase à spectre étendu, CHN : céphalosporinase haut niveau.

3.4-Bêta-lactamases

Les bêtalactamases sont des enzymes qui hydrolysent le noyau β -lactame, structure de base des β -lactamines, en donnant selon la cible des acides inactifs. La diversité des β -lactamases a entraîné de nombreuses tentatives de classification, deux sont actuellement utilisées (Tableau 3) ;

- **La classification de Ambler dite structurale (4)**

Proposée en 1980 est basée sur la structure primaire de l'enzyme, notamment la séquence primaire en acide aminés d'éléments conservés du site actif. Elle individualise quatre classes moléculaires A, C, D (appelées sérines enzymes) et B (dont les enzymes comportent deux atomes de zinc au niveau de leur site actif).

- La classe A correspond aux pénicillinases et aux β -lactamases chromosomiques ou plasmidiques sensibles à l'acide clavulanique.
 - La classe B comprend les métalloenzymes, inhibées par l'EDTA.
 - La classe C inclut les céphalosporinases résistantes à l'acide clavulanique, habituellement chromosomiques.
 - La classe D rajoutée après la description originale regroupe les oxacillinases.
- **La classification de Bush dite fonctionnelle** (36) élaborée en 1989 et réactualisée en 1995, est basée (i) sur les propriétés fonctionnelles des enzymes, (ii) sur le spectre de substrats préférentiels des enzymes et (iii) sur l'activité hydrolytique et la sensibilité aux inhibiteurs. Cependant, la limite évidente de cette classification est que des mutations ponctuelles des gènes de β -lactamases peuvent modifier significativement les spectres d'activité pour les différents substrats ou pour les inhibiteurs, ce qui n'est pas le cas pour la classification
- d'Amblar qui reste valable pour les enzymes mutées.
- Le groupe 1 comprend les β -lactamases chromosomiques de la classe C (type AmpC). Les bactéries produisant de telles β -lactamases sont résistantes à bas niveau aux pénicillines, aux inhibiteurs de β -lactamases, à la cefoxitine (en fonction des espèces). La production de ces enzymes est inductible par différents antibiotiques parmi lesquels: la cefoxitine, l'acide clavulanique ou encore l'imipénème
 - Le groupe 2 est de loin le plus vaste et comporte des β -lactamases le plus souvent inhibées par l'acide clavulanique. La plupart de ces enzymes ont un support plasmidique et toutes appartiennent à la classe moléculaire A, exceptées les oxacillinases qui appartiennent à la classe D.
 - Le groupe 3 regroupe les métallo- β -lactamases de la classe B conférant la résistance à la quasi-totalité des β -lactamines (carbapénèmes, céphalosporines et pénicillines) exceptés les monobactames et sont inhibées par les agents chélateurs (EDTA) mais pas par l'acide clavulanique.
 - Le groupe 4 rassemble moins d'une dizaine d'enzymes, peu rencontrées à ce jour, insensibles à l'acide clavulanique et ne pouvant être classées parmi les autres groupes.

Grâce aux banques de données donnant accès aux séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques, il est désormais possible de relier ces deux classifications : une synthèse figure dans le tableau 3.

Tableau 3: Classification des β -lactamases d'après Bush-Jacoby-Medeiros (36)

Classe moléculaire (Ambler)	Groupes fonctionnels (Bush & al.)	Type de β -lactamase et exemples représentatifs	Bactéries impliquées	Inhibition par acide clavulanique	Inhibition par EDTA	β -lactamines hydrolysées	β -lactamines stables
β-lactamases à sérine active Classe A	2a	Pénicillinasés	Bactéries à Gram positif	++	-	Pénicillines sauf pénicillines M	Pénicillines M, C1G, carbapénèmes
	2b	β -lactamase à large spectre TEM-1 & 2, SHV-1 plasmidiques et chromosomiques	Bactéries à Gram négatif	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztreonam
	2be	β -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztreonam SHV-2 à 9, TEM-3 à 29, VEB-1, plasmidiques	Entérobactéries, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	Idem 2b + C3G et aztreonam	Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes
	2br	β -lactamases à large spectre résistant à l'acide clavulanique TRI : dérivé TEM-30 à -41, plasmidiques	Entérobactéries	-	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de β -lactamases	Idem 2b
	2c	Carbénicillases PSE-1, PSE-3, PSE-4 plasmidiques	Bactéries à Gram négatif	+	-	Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinasés chromosomiques inhibés par l'acide clavulanique - Cefuroxime Cum A (<i>P. vulgaris</i>), - L2 (<i>S. maltophilia</i>)	Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries)	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G, certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztreonam, carbapénèmes
	2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibés par l'acide clavulanique Ex : IMI-1, NMC-A, chromosomiques	Entérobactéries	+	-	Idem 2b + aztreonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
Classe C	1	Céphalosporinase AmpC chromosomiques (Entérobactéries*, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.) et plasmidiques (CMY, FOX, MOX, MIR-1...)	Bactéries à Gram négatif	-	-	Toutes les β -lactamines sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes
Classe D	2d	Oxacillinasés OXA-1 à -20 plasmidiques et chromosomiques	Bacilles à Gram négatif	V	-	Idem 2b (+ parfois C3G, aztreonam ou carbapénème)	Variable
Pas de classe attribuée	4	Enzymes indéterminés Ex : enzymes chromosomiques de <i>C. jejuni</i> , <i>C. cepacia</i> ...	Espèces variées	-	-	Variable	Variable
β-lactamases Zinc-dépendances Classe B	3	Métallo- β -lactamases IMB-1/3 chromosomiques ou plasmidiques, enzymes chromosomiques de <i>Aeromonas</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>S. maltophilia</i> L1	Bactéries à Gram négatif	-	++	Large profil de substrats dont les carbapénèmes	Variable

Inhibition : inhibiteur fort++, inhibiteur modéré+, négligeable -, V : variable
 * *E. coli* (bas niveau), *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *M. morgani*, *S. marcescens*, *H. alvei*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*

3.5- Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

3.5-1- Définition des BLSE

Le terme β -lactamase à spectre étendu (BLSE) a d'abord été utilisé pour définir un large spectre de β -lactamase pour qui la substitution d'acide aminé peut étendre son spectre d'hydrolyse. Les BLSE sont des β -lactamases de classe A selon la classification d'Ambler, et selon la classification de Bush-Jacoby-Medeiros, les BLSE font aussi partie du groupe 2be, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, C1G, C2G, C3G (ex. céfotaxime, ceftazidime) et les C1G et les monobactames (ex. aztreonam). Par contre, les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines (ex. céfoxitine) et aux carbapénèmes (ex. imipénème). Enfin, les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique.

3.5-2- Types des BLSE

- **Les premières BLSE** décrites chez les entérobactéries, confèrent la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), au céfépime et à l'aztréonam. Ces BLSE dérivent par mutation ponctuelle des pénicillinases TEM (Temoneira-nom du patient) : TEM-1, TEM-2 et SHV-1 (Sulphydryl-variable) (21). SHV-1 correspond à un gène de pénicillinase chromosomique transposé sur un plasmide sa première détection était en Allemagne en 1980 chez une souche de *K. pneumoniae* (114). La nature des mutations détermine le spectre d'action de l'enzyme. Il permet de les classer schématiquement en deux grands groupes: les ceftazidimases qui confèrent un plus haut niveau de résistance à la ceftazidime qu'au céfotaxime (ex : TEM-5, TEM-24, SHV-4, SHV-5) et les céfotaximases qui confèrent un niveau de résistance équivalent à ces deux molécules (ex : TEM-3, SHV-2). Plus de 195 types de BLSE TEM et 143 types SHV ont été décrits (www.lahey.org/studies/webt.htm). Ces BLSE appartiennent à la classe moléculaire A et sont détectées par la mise en évidence d'une synergie dite en « bouchon de champagne » entre l'acide clavulanique et les C3G (107). Seuls les céfamycines et les carbapénèmes sont stables vis-à-vis de l'hydrolyse par les BLSE.
- **Les BLSE de type CTX-M** plus récentes, Leur dénomination de céfotaximase est liée à leur pouvoir hydrolytique plus important envers le céfotaxime comparé à la ceftazidime et « M » pour Munich» indiquant leur premier lieu d'isolement (13). Ce sont des BLSE non-TEM non-SHV qui sont les plus répandues actuellement puisque, depuis 1995, elles

émergent sur tous les continents en particulier le variant CTX-M-15. Il existe environ 90 types qui sont classés en 5 clusters (cluster CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX M-25) selon les similarités de leurs séquences protéiques (41)

- **Les autres BLSE** sont caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam plutôt qu'au céfotaxime ; elles ont une distribution moins large que le groupe CTX-M (29). Dans ce groupe sont individualisées BES-1 (*brazilian extended spectrum*) (21), GES-1 (*Guyana extended spectrum*), PER-1 (*Pseudomonas extended resistance*) (211), SFO-1 (*Serratia fonticola*)(134), TLA-1 (Tlahuicas, tribu mexicaine) (145),(190) et enfin VEB-1 (*Vietnam extended spectrum*) (145),(211). Des enzymes proches de GES-1 ont été découvertes en Grèce, malheureusement dénommées à tort IBC (*Integron Borne Cephalosporinase*) (IBC-1, IBC-2) (87).

3.5.3- Epidémiologie des BLSE

Les BLSE de type TEM et SHV ont très rapidement et largement été diffusés dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. Au cours des années 1990-98, elles ont été responsables de grandes épidémies de colonisations et d'infections nosocomiales en particulier dans les services de soins intensifs où l'utilisation des C3G est très commune. Elles sont principalement liées aux espèces *K. pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* (158). De plus, les plasmides de *K. pneumoniae* ont une très grande stabilité. Ainsi, des années après l'arrêt du traitement par la ceftazidime ou d'autres C3G, des *K. pneumoniae* BLSE colonisent toujours certains malades (98). A la fin des années 90, un renversement de situation avec l'émergence des CTX-M était noté. En effet, après une diminution significative des BLSE de type TEM et SHV, la prévalence des CTX-M a explosé. Ces dernières sont devenues endémiques sur tous les continents (38,95) (figure 2).

L'épidémiologie actuelle est dominée par la diffusion de l'enzyme CTX-M-15 (88),(182). Bien que *E. coli* producteur de CTX- M représente actuellement la majorité des BLSE, on observe depuis quelques années une ré-augmentation de la prévalence des KpBLSE dans les hôpitaux.

Les données recueillies de janvier 2004 à août 2006 (4916 isolats) en Asie, en Europe, en Amérique du Nord et en Amérique Latine indiquent que la prévalence des *K. pneumoniae* productrices de BLSE (KpBLSE) était plus élevée en Amérique latine (44%) et en Asie (22,4%) qu'en Europe (13.3%) ou en Amérique du Nord (7.5%) (213). En Europe, la Grèce était le pays où la prévalence de *K. pneumoniae* BLSE était la plus élevée (44%) alors qu'aucune souche n'était rapportée au Danemark, en Finlande, en Suisse, en Autriche, en Irlande, en République

Tchèque et en Hollande. En Amérique latine, des épidémies à KpBLSE (CTX-M-1 ou CTX-M-2) ont été décrites (61). En Asie, la place des CTX-M semble largement prédominante chez *K. pneumoniae*. En revanche, en Amérique du Nord, les enzymes de type SHV, notamment SHV-5 restent les plus fréquentes et, parfois encore à l'origine d'épidémies. Ainsi, les BLSE de type SHV (SHV-2, -2a, -5 et -12), semblent persister sur tous les continents, notamment en Europe (38).

En Algérie, le gène CTX-M-15 reste le plus impliqué dans les épidémies hospitalières, après sa première détection dans un hôpital à Bejaia par *Touati et al* en 2005, ce qui confirme la diffusion mondiale de ce gène (206). En 2009, la prévalence des KpBLSE à l'est de l'Algérie avoisinait les 60% (147). Par ailleurs, cette prévalence a dépassé les 80% à l'ouest de l'Algérie en 2012 (7), ce qui signale l'augmentation du taux des KpBLSE au niveau des hôpitaux Algériens.

Enfin, les BLSE plus rares, comme PER ou VEB, ont des répartitions géographiques différentes. Ainsi l'enzyme VEB-1 est très répandue dans le sud-est asiatique alors que PER-1 est prépondérante en Turquie et PER-2 n'a été décrite qu'en Argentine (173) et l'enzyme TLA-1 au Mexique (38). En Algérie, les enzymes PER-1 ou VEB-1 ont été observés de façon sporadique chez *Proteus* (102) et *Enterobacter* (103).

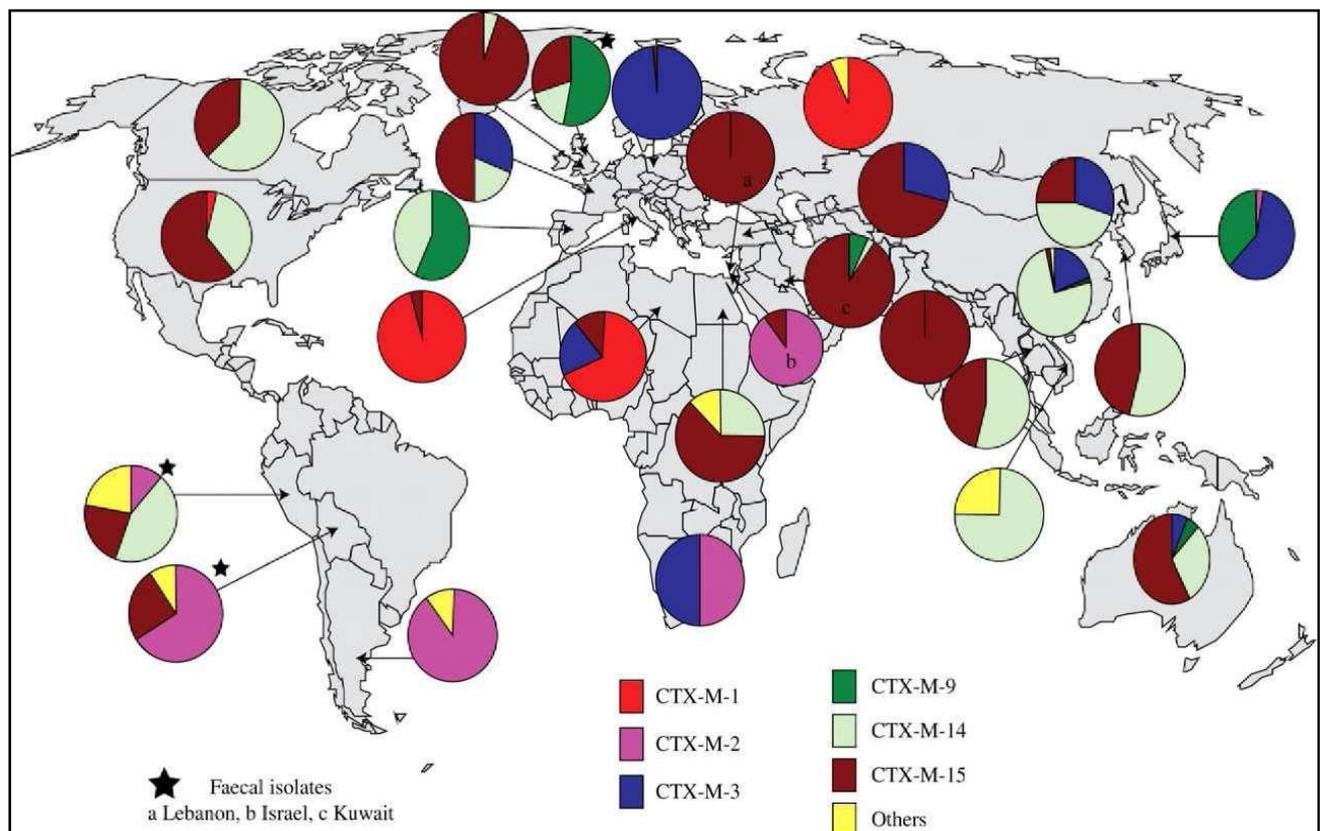


Figure 2: Distribution mondiale des génotypes de CTX-M (98).

3.6-Les Carbapénèmes

Les carbapénèmes sont de plus en plus utilisés en milieu hospitalier car ce sont souvent les médicaments de dernier recours pour traiter les infections graves causées par les KpBLSE (25). Au cours de ce traitement, le taux élevé de KpBLSE présente un risque d'émergence de nouvelles carbapénémases.

Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes était liée à l'association de la production de Case ou de BLSE avec une diminution de perméabilité. S'y est ajoutée récemment l'apparition de nouvelles enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes. Ces dernières ont émergé dans 3 des 4 classes moléculaires de Ambler : la classe A comprend notamment les enzymes de type KPC, la classe B, les métallo- β -lactamases comme VIM ou plus récemment NDM-1 et enfin la classe D comprend des enzymes comme OXA-48.

- **Les carbapénémases de classe A** de type KPC et GES (groupe fonctionnel 2f) sont plus inquiétantes car codées par des plasmides qui ont permis leur diffusion. Elles peuvent conférer une résistance à l'ensemble des β -lactamines, y compris les céphamycines, les C3G, les C4G et les carbapénèmes et elles sont partiellement inhibées par l'acide clavulanique.
- **Les carbapénémases de classe B** (groupe fonctionnel 3) Les métallo- β -lactamases (MBL) sont essentiellement des enzymes de type IMP (IMiPéménase) ou VIM (Verona IMipéménase) responsables d'épidémies hospitalières sévères dans certains pays, particulièrement en Asie et en Europe du Sud. Ces MBL possèdent des ions zinc dans leur site actif et hydrolysent fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztreonam. Leur activité est inhibée par l'EDTA. En Algérie, le gène VIM a été déjà détecté chez deux souches de *K. pneumoniae* à l'hôpital militaire d'Alger en 2008 (180). Par contre, aucune souche de *K. pneumoniae* exprimant le gène IMP n'était rapportée.

NDM-1 (*New Delhi metallo- β -lactamase 1*), identifiée en 2008, est une nouvelle zinc-métallo- β -lactamase identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* et dans une souche d'*E. coli* provenant respectivement d'un prélèvement urinaire et rectal chez un patient suédois rapatrié après un séjour dans un hôpital de New Delhi (216,216). Cette enzyme a déjà une diffusion internationale avec des cas rapportés dans le monde entier (154). Des données récentes suggèrent que les Balkans et le Moyen Orient constitueraient un réservoir secondaire dans la dissémination de NDM-1 dont le rapport avec l'Inde n'est pas établi. En Algérie aucun cas de *K. pneumoniae* exprimant le gène NDM-1 n'était rapporté contrairement à nos voisins le Maroc (11,166) et la Tunisie (16).

- Carbapénémases de classe D :** L'enzyme OXA-48, initialement décrite dans une souche de *K. pneumoniae* isolée en Turquie (167), hydrolyse faiblement les pénicillines et carbapénèmes mais pas les C3G. Cette particularité la rend difficile à détecter en l'absence d'un autre mécanisme de résistance associé aux β -lactamines. Elle peut-être associée à une BLSE, en particulier CTX-M-15 et SHV-12, rendant les souches résistantes à toutes les β -lactamines (169) OXA-48 a largement été diffusé dans de nombreux hôpitaux des pays du pourtour méditerranéen (Turquie (42), France (54), Espagne (160), Egypte (165), Maroc (18), Lybie (115), Tunisie (53)) à l'exception de l'Algérie.

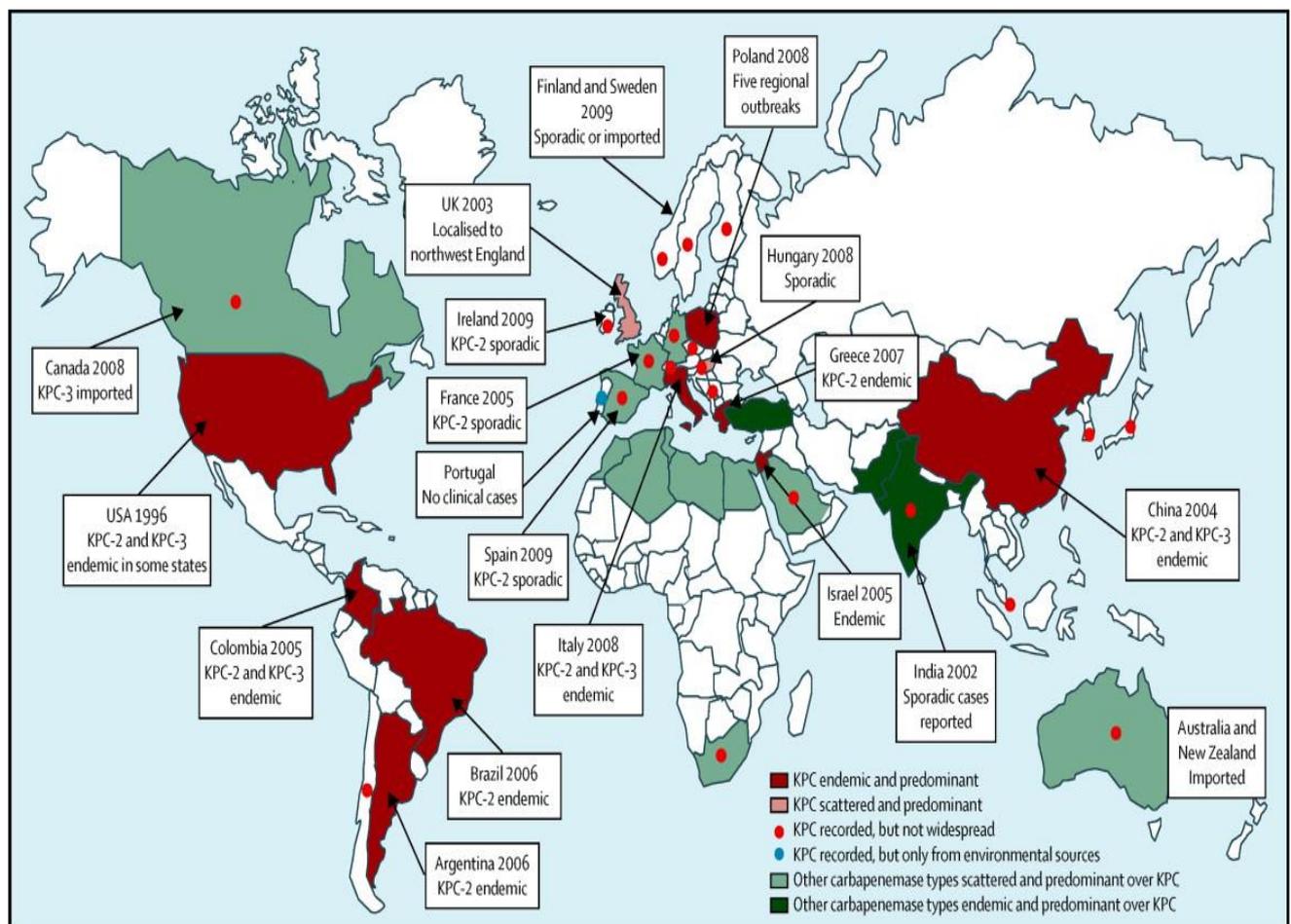


Figure 3 : Epidémiologie des souches *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases (142)

4- Aminosides et *K. pneumoniae*

Les aminosides ont un large spectre antibactérien qui comprend les bactéries à Gram négatif et positif. Le traitement des infections nosocomiales graves à bacilles à Gram négatif nécessite leur utilisation le plus souvent en association avec une β -lactamine ou une fluoroquinolone (210).

Les aminosides sont formés d'un cycle à 6 atomes de carbone de type aminocyclitol relié par des liaisons glycosidiques à un ou plusieurs dérivés de sucres. L'aminocyclitol peut être la streptidine ou plus souvent le 2-déoxys-treptamine (2-DOS) d'où une première classification en deux sous familles. Le cycle 2-DOS peut être substitué en position 4 et 5 (groupe 4,5-2-DOS : néomycine, paromomycine) ou en position 4 et 6 (groupe 4,6-2-DOS : amikacine, kanamycine, gentamicine, isépamicine, nétilmicine, tobramycine) (49).

Les Actinomycètes tels que *Streptomyces spp* et *Micromonospora spp* sont les producteurs naturels des aminosides. Ces actinomycètes ont une résistance intrinsèque aux aminosides, parce qu'ils hébergent le gène l'ARNr 16S méthyltransférase, qui peut conférer une résistance de la bactérie en modifiant des résidus nucléotidiques spécifiques dans le site de liaison d'aminoside de l'ARNr 16S (52).

4.1- Mode d'action

La plupart des aminosides se lient à l'aminocycl-ARNt site de décodage de reconnaissance (site A) de l'ARNr 16S qui compose le ribosome bactérien 30S, et interfèrent ensuite avec la croissance des bactéries à travers le blocage de la synthèse des protéines (129).

Les aminosides exercent des effets pléiotropes sur la bactérie, et inhibent la traduction aux stades d'initiation, d'élongation et de terminaison. Par ailleurs, ils interagissent avec le système de transport des électrons de la chaîne respiratoire, provoquent des désordres ioniques, altèrent les enveloppes bactériennes et affectent indirectement la réplication de l'ADN (49).

4.2-Mécanismes de résistance

Les mécanismes généraux de résistance aux aminosides sont :

4.2.1-Altération de la cible

Le mode d'action des aminosides laisse présager la mutation de l'ARN 16S comme moyen de résistance. Trois activités de méthylation de l'ARN 16S modifient le site A aux positions G₁₄₀₅ (N7), A₁₄₀₈ et C₁₄₀₇ (N5) (14) (figure 4).

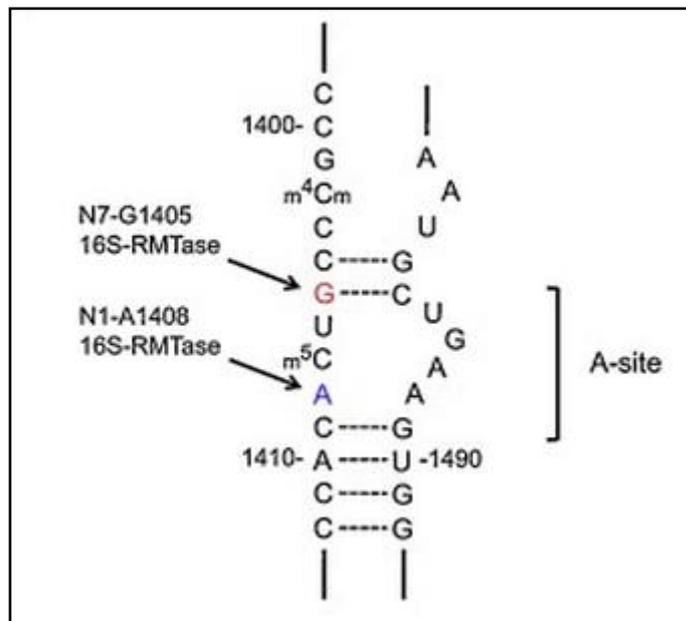


Figure 4: Site-A : la région qui porte les ARNr16S méthyltransphérase (210)

- **La méthylation G₁₄₀₅ de l'ARN I6S** confère une résistance de haut niveau à 4.6-2-DOS (amikacine, gentamicine, kanamycine, nétilmycine et tobramycine) mais n'affecte pas l'activité des 4.5-2-DOS (neomycine et paromomycine). Cette méthylation de l'ARNr I6S a été récemment rapportée chez les bactéries pathogènes pour l'homme. Dix gènes ont été décrits *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* et *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* et *npmA*(64) avec prédominance du genre *armA* et *rmtB* (210). Le gène *ArmA* a été détecté pour la première fois en 2003 en France chez une souche de *K. pneumoniae* montrant un haut niveau de résistance à tous les aminosides cliniquement cruciaux. Ce gène était porté sur un plasmide, du groupe d'incompatibilité IncL/M à large spectre d'hôte, capable de répliquer chez les entérobactéries et qui confère également la résistance au céfotaxime par la production de la β -lactamase CTX-M3 (85). Récemment, des souches de *Salmonella* ont été signalées de plus en plus en Chine et en Algérie (74,143). Le gène *rmtB* a été largement répandu chez les entérobactéries de l'Asie orientale, l'Europe et Amérique (83,110) (figure 5). La plupart des gènes 16S ARNr Methylase ont été situés sur des plasmides transférables et peuvent être facilement transférés à d'autres espèces bactériennes ce qui a favorisé leur propagation mondiale qui devient actuellement une préoccupation surtout avec la diffusion rapide des membres d'entérobactéries qui produisent NDM-1(MBL) (99), constituant une menace sérieuse pour la santé humaine.

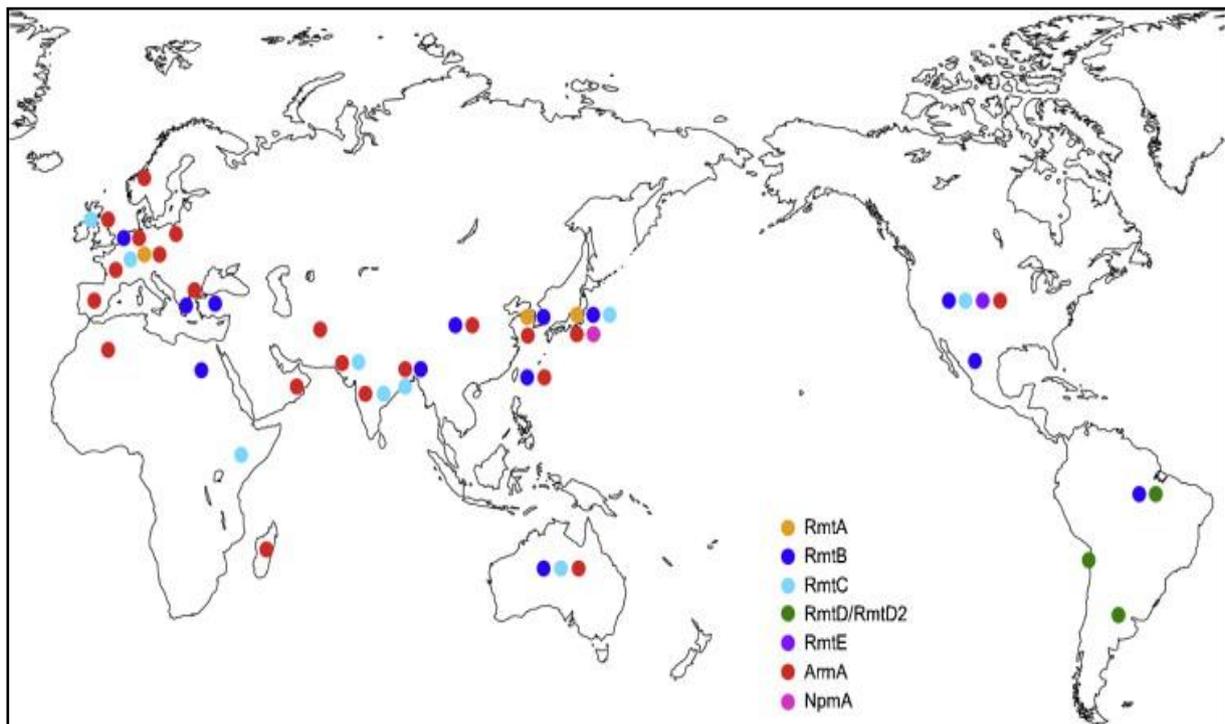


Figure 5: Distribution mondiale de la résistance aux aminosides des bactéries produisant 16S ARNr méthyltransférase qui ont été isolées (210).

4.2.2-Modification enzymatique de l'antibiotique

Lorsqu'un aminoside est modifié par des enzymes bactériennes sa fixation sur 1' ARN 16S peut être affectée et se traduire par la perte de son activité. Les enzymes modificatrices des aminosides sont le mécanisme de résistance le plus courant chez les bactéries Gram négatif et positif. Elles ont été regroupées en fonction de la réaction qu'elles catalysent (175) (figure 6):

- Acétylation d'un groupement aminé [N- acétyltransférase (AAC)].
- Phosphorylation d'un groupement hydroxyle [O- phosphotransférase (APH)].
- Nucléotidylation d'un groupement hydroxyle [O-nucléotidyltransférase (ANT)].

Les bactéries pathogènes ont acquis ces enzymes *via* des plasmides transférables portés par des bactéries qui ont un système spécifique de recombinaison d'ADN comme les transposons et les intégrons (157),(204).

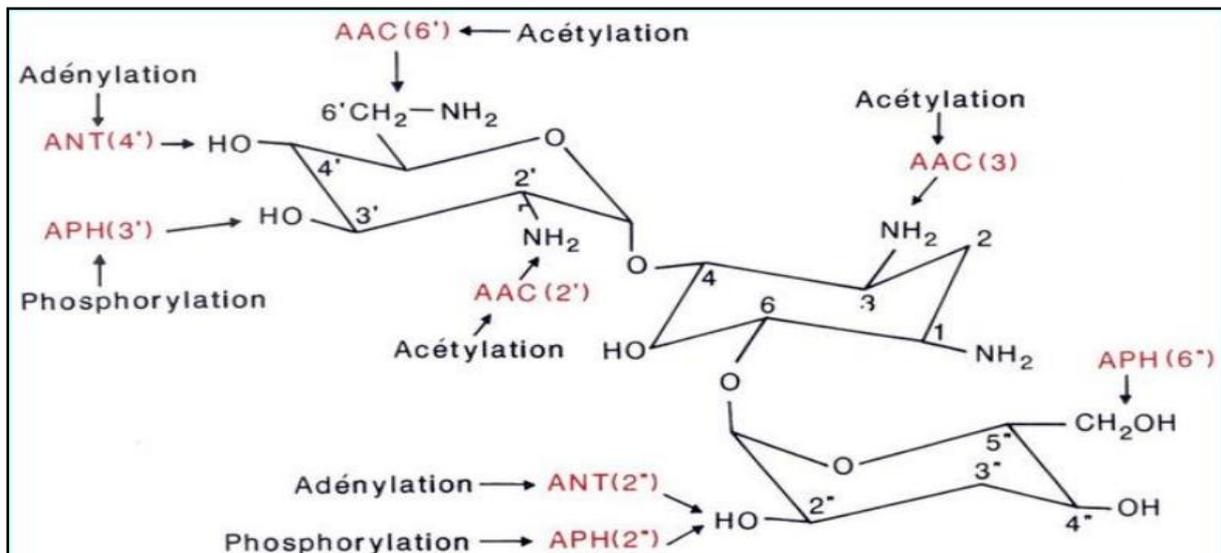


Figure 6 : Les enzymes modificateuses des aminosides (49).

4.2.3-Piégeage de l'antibiotique

Une enzyme modificateuse peut parfois neutraliser l'action d'un aminoside par une liaison affine sans pour autant modifier sa structure. Le piégeage de l'antibiotique a été proposé comme mécanisme responsable du phénotype de résistance à la kanamycine et à la tobramycine alors que la gentamicine et la nétilmicine restent actives. Lorsque la bactérie produit une grande quantité de la phosphotransférase qui reconnaît la tobramycine sans la modifier celle-ci peut être piégée dans un complexe enzyme-substrat fonctionnellement inactif (137).

4.2.4-Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique

L'accès de l'aminoside à sa cible met enjeu différentes étapes. Compte tenu de leur caractère hydrophile les aminosides pénètrent la membrane externe des bactéries à Gram négatif par les porines (93). Le passage par la voie lipophile est associé à leur caractéristique polycationique par substitution avec le calcium ou le magnésium de la membrane externe. La deuxième étape consiste en la traversée de la membrane cytoplasmique hydrophobe et requiert l'énergie de la force proton motrice produite par la chaîne respiratoire (57).

Certaines bactéries peuvent exporter les aminosides grâce à des systèmes d'efflux. Toutefois, les aminosides sont rarement substrats de ces pompes.

4.3- Phénotypes de résistance aux aminosides

Le tableau 4 montre les phénotypes de résistance des entérobactéries aux aminosides selon Jehl et al, 2003

Tableau 4: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux aminosides (108)

Phénotype	Enzymes	Gent ami- cine	Tobrami -cine	Netilmi -cine	Amika -cine	Isépamy -cine	Espèces
G	AAC(3)-I	R	S	S	S	S	<i>E-coli</i> , <i>P-mirabilis</i> <i>K-pneumoniae</i> <i>Enterobacter-cloacae</i>
A	APH (3')VI	S	S	S	R	R	<i>E-cloacae</i>
GT	AAC (3)-VI	R	R	S	S	S	<i>E-coli</i>
TA	ANT (4')-II	S	R	S	R	R	Toutes
GTNt	AAC (2')-I AAC (3)-IV	R R	R R	R R	S S	S S	<i>P-stuartii</i> , <i>E-coli</i>
KTG	ANT (2'')-I	R	R	S	S	S	Toutes
KTANt	AAC (6')-I	S	R	R	R	S	<i>S-marcesens</i> , <i>E-coli</i> <i>K-pneumoniae</i> , <i>E-cloacae</i> <i>E-aerogenes</i>
KTGNt	AAC(3)-II	R	R	R	S	S	Toutes
KTGANt	Imperméabilité Association enzymes	R R	R R	R R	R R	R R	Toutes Toutes

5-Quinolones et *K. pneumoniae*

Les quinolones sont des composés antibactériens de synthèse dont le chef de file, l'acide nalidixique, a été décrit en 1962 par Lesher et coll (123). Toutes ces molécules possèdent un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué et présentent une fonction cétone en 4 et un groupement carboxylique en 3. Ce cycle est accolé à un autre cycle aromatique variable : benzène, pyridine, pyrimidine (49).

Les fluoroquinolones se caractérisent par la présence d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine, en position 7 (49).

5.1-Mode d'action

Les quinolones exercent une inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse, qui sont :

- l'ADN gyrase est topoisomérase de type II responsable du surenroulement de type négatif de l'ADN lors de la réplication. L'ADN gyrase est constituée de deux sous-unités A et B. La sous-unité A est une protéine codée par le gène *gyrA* : elle est essentiellement impliquée dans la coupure des brins d'ADN précédant le surenroulement et constitue la cible principale des quinolones chez les bactéries à Gram négatif. La sous-unité B est une protéine codée par le gène *gyrB* : elle est responsable de l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions catalysées par l'enzyme (73).
- l'ADN topoisomérase IV constitue une seconde cible intracellulaire des quinolones. Deux gènes, *parC* et *parE*, codent respectivement pour les deux sous-unités ParC et ParE. Cette enzyme semble avoir un rôle spécifique, le désenchevêtrement des ADN-fils en fin de réplication (73).

Les quinolones exercent une activité bactéricide pendant la phase de multiplication et de repos des bactéries (124).

5.2-Mécanismes de résistance

Deux principaux mécanismes de résistance aux quinolones chez *K. pneumoniae* s'exercent séparément ou en combinaison et confèrent des niveaux de résistance variables.

- la résistance par mutation chromosomique qui est due, soit à la diminution d'affinité des cibles intracellulaires qui sont les complexes ADN-ADN gyrase et ADN-ADN topoisomérase IV, soit à la diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique,

par défaut de pénétration passive et/ou excrétion active (124). La perte d'affinité pour la cible provient de modification structurale dans une région appelée la QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*), où sont trouvées la majorité des mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones.

- la résistance plasmidique est due à la protection de l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. Cette résistance est décrite pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *K.pneumoniae* hébergeant un plasmide portant le gène *qnrA* qui code pour une protéine Qnr A (104). Un second gène *qnrB*, présentant 49,5 % d'identité avec *qnrA*, a été individualisé récemment et la protéine QnrB présente 39.5 % d'identité avec QnrA (105). Dernièrement, un autre mécanisme de résistance plasmidique s'effectue par l'inactivation des quinolones par l'acetyltransférase *aac* (6')-Ib-cr (179), ce variant confère la résistance simultanée aux fluoroquinolones et aux aminosides.

Il n'existe pas de critères phénotypiques sur un antibiogramme permettant de distinguer les mécanismes de résistance chromosomiques et plasmidiques aux quinolones. La détection de ces mécanismes repose sur des techniques de Biologie Moléculaire.

5.3-Phénotypes de résistance aux quinolones

Le tableau 5 montre les phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones selon *Jehl et al*, 2003.

Tableau 5: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones (108)

Phénotype	Acide nalidixique	Norfloxacin	Péfloxacin	Ofloxacin	Ciprofloxacine
I	S	S	S	S	S
II	R	S	S	S	S
III	R	I/R	I/R	S	S
IV	R	R	R	R	R
Rare efflux (<i>E.coli</i>)	S	R	S	S	S

Partie 2 : Matériel et Méthodes

1-Cadre et Objectifs de l'étude

Ce travail représente une étude prospective, portant sur 100 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de patients hospitalisés dans les centres hospitaliers universitaires (CHU) d'Annaba-Algérie.

Ces établissements hospitaliers à vocation régionale rayonnent sur un bassin de population de 4 millions d'habitants qui s'étendent sur cinq wilayas, à savoir Annaba, Guelma, Souk Ahras, Tébessa, et El Taref. Les CHU d'Annaba regroupent 39 services, et présentent une capacité de 1072 lits répartis comme suit: l'Hôpital Dorban (189 lits) où sont localisés les services de pneumologie, d'infectiologie, d'hématologie et le service d'ORL ; l'Hôpital Ibn Rochd (450 lits) qui regroupe les services d'urologie, de réanimation chirurgicale, de chirurgie générale et la traumatologie ; l'Hôpital Ibn Sina (243 lits) qui regroupe des services d'endocrinologie, de néphrologie, de réanimation médicale, et de cardiologie ; enfin, l'Hôpital pédiatrique de Sainte-Thérèse (95 lits) regroupant la réanimation pédiatrique et la pédiatrie.

Contrairement à de nombreuses régions du monde, il existe peu d'informations concernant la caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques et la relation clonale des souches de *K. pneumoniae* isolées en Algérie et particulièrement aux niveaux des hôpitaux d'Annaba.

Les objectifs de cette étude consistaient à (i) mettre en évidence la prévalence des souches de *K. pneumoniae* multi résistantes isolées aux niveaux des hôpitaux de la ville d'Annaba, (ii) identifier le support génétique de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones, (iii) d'étudier la possibilité de transfert de cette résistance entre les bactéries et enfin, le typage moléculaire des souches de *K. pneumoniae*. Cela peut aider dans le processus décisionnel du traitement et l'identification rapide des épidémies à fin de mettre en œuvre les mesures de contrôle appropriées de la propagation des infections.

Pour cela, nous avons eu recours à diverses techniques de Biologie Moléculaire telle que la PCR, le séquençage, MLST ainsi qu'à des expériences de conjugaison bactérienne. Les examens bactériologiques ont été réalisés au sein du laboratoire central de Microbiologie de l'hôpital de Dorban et le laboratoire de recherche du département de Biochimie de l'université Badji-Mokhtar d'Annaba. Les techniques de Biologie Moléculaire ont été menées en partenariat avec l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, UMR CNRS-6236,

IRD189, IFR48, Faculté de Médecine et de pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

2- Souches bactériennes

100 souches non répétitives de *Klebsiella pneumoniae* issues de prélèvements cliniques à visée diagnostique de patients hospitalisés dans différents services des CHU de la ville d'Annaba ont été recueillies au cours d'une période de 23 mois (Février 2010 à Décembre 2011).

Les prélèvements provenant de divers produits pathologiques (urine, sang, pus et sécrétions respiratoires) ont été effectués selon la technique appropriée à chaque prélèvement ; ensuite, les souches de *K. pneumoniae* ont été isolées et identifiées par le personnel du laboratoire central de Microbiologie du CHU Dorban. Ainsi, des informations concernant chaque prélèvement effectué ont été recueillies de manière prospective : type de service où le patient a été admis, type du prélèvement, la date, l'âge et le sexe du patient.

L'ensemble des milieux de culture, réactifs et appareillage seront cités au fur et à mesure de leur utilisation.

3-Isolement et identification des souches

Les isolats ont été cultivés sur le milieu Mac Conkey ou le milieu Hektoen et incubés pendant 24 heures à 37°C. L'identification des isolats a été réalisée par la galerie API 20E (Bio-Mérieux, France) puis confirmées par spectrométrie de masse en utilisant un spectromètre de masse MALDI-TOF couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry). (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (188).

3.1- API 20E (BioMérieux, Meylan, France) :

C'est un système miniaturisé d'identification biochimique qui comporte 20 micro-tubes de substrats déshydratés, la suspension bactérienne répartie dans les micro-tubes dissous les substrats. Après incubation, les réactions sont mises en évidence par les virages colorés spontanés ou par l'ajout de réactif. La lecture de la galerie est faite à l'aide d'un codeur qui transforme automatiquement les 20 résultats des tests biochimiques en nombre de 7 chiffres appelé « profil numérique » (6) (tableau 6); l'identification est alors obtenue grâce au catalogue analytique.

Tableau 6: Traduction des profils numériques de *Klebsiella pneumoniae* en caractères biochimiques

	5215773	5205773	5205573	5215573	5214573
ONPG	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	-
CIT	+	+	-	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-
UREE	+	-	-	+	+
TDA	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-
GEL	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	+	+	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+

3.2-Spectromètre MALDI-TOF (Microflex):

C'est une technique basée sur le profil protéique des bactéries qui permet en quelques minutes et avec une haute précision leurs identifications (188). Cette technique se réalise en 4 étapes :

3.2.1- Nettoyage de la cible (plaque métallique)

Matériel

- Hotte chimique
- Pipette réglable
- Eprouvette graduée
- Papier de précision (type Kim Wipes)
- Ethanol 70%
- Trifluoroacetic acid TFA 80%
- Eau HPLC

Méthode

- Rincer la cible sous l'eau chaude du robinet en frottant avec du papier de précision afin de ne pas la rayer,
- Rincer avec de l'éthanol à 70% en frottant avec du papier de précision,
- Répéter les deux premières étapes,
- Placer la cible dans un petit réservoir en inox ou céramique et la recouvrir d'éthanol 70%,
- Laisser agir pendant 15 minutes puis éliminer l'éthanol dans la poubelle appropriée,
- Déposer sur la cible 500 µl de TFA 80 %, frotter avec du papier de précision,
- Rincer la cible avec de l'eau HPLC et laisser sécher 15 minutes.

3.2.2- 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

- Hotte chimique
- Bain à ultrasons
- Centrifugeuse
- Réactifs : Alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA), Acétonitrile , (TFA à 10%).

Méthode

- Dans un tube à Eppendorf, mettre 2g de HCCA
- Ajouter 500 µl d'acétonitrile
- Ajouter 250 µl de TFA à 10%
- Ajouter 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer 10 min (la solution doit être trouble)
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm
- Transférer le surnageant dans un tube propre, la matrice est prête à être utilisée.

3.2.3- Dépôt des échantillons

Matériel

- Poste de sécurité microbiologique (PSM)
- Cône fin

- Cible (plaque métallique)
- Matrice

Méthode

- Compléter le plan de la cible MALDI utilisée en indiquant la référence des échantillons déposés
- Déposer les échantillons dans la zone appropriée en prélevant les isolats à identifier à partir d'une colonie bactérienne de 24 heures de façon la plus homogène possible et de façon à obtenir une fine couche sur la cible (support métalliques en acier inoxydable avec 96 puits à l'aide d'une pointe de cône. Pour chaque isolat, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.
- Déposer 1.5µl de matrice sur chaque spot.
- Laisser sécher pendant 5 min sous la hotte pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

3.2.4- Insertion de la cible et lancement du spectromètre de masse

- Introduire la plaque (la cible) dans le Microflex.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.
- Lancer le spectromètre de masse : Microflex.

3.2.5- Lecture et interprétation des résultats

Le 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 micro-organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent chez tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue, ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. Le résultat d'identification par MALDI-TOF est donné avec le logiciel MALDI Biotyper par un score compris entre zéro et trois. On considère qu'une bactérie est identifiée de façon fiable lorsque le score d'identification est supérieur à 1,9.

4-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité des souches vis-à-vis 20 antibiotiques (tableau 7) a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (196).

Les boîtes de gélose Mueller Hinton sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne correspondant à 0.5 Mac Farland et les disques d'antibiotiques y sont déposés sur la gélose. Les boîtes sont ensuite, incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés et l'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (196).

Tableau 7: Antibiotiques testés

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Famille	
Céftazidime	CAZ	30µg	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération	β-lactamines
Céfotaxime	CTX	30µg		
Céftriaxone	CRO	30µg		
Céfalotine	CF	30µg	Céphalosporine de 2 ^{ème} génération	
Cefoxitine	FOX	30µg		
Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	20µg/10µg	Aminopénicillines+ inhibiteur de β-lactamase	
Aztréonam	ATM	5µg	Monobactames	
Imipénème	IMP	10µg	Carbapénèmes	
Tobramycine	TM	30µg	Aminosides	
Amikacine	AK	10µg		
Gentamicine	GN	10µg		
Kanamycine	K	10µg		
Ofloxacin	OFX	5µg		Quinolones
Norfloxacin	NOR	5µg		
Pefloxacin	PEF	5µg		
Acide Nalidixique	NA	30µg		
Ciprofloxacine	CIP	5µg		
Triméthoprime-Sulfaméthoxazole	SXT	1,25µg/23,75µg	Sulfamides	
Colistine	CS	50µg	Polymyxines	
Fosfomycine	FOS	50µg	Les acides fosfoniques	

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

Les CMI ont été déterminées pour les souches productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) en utilisant les bandelettes E.test des principales familles d'antibiotiques (β -lactamines, aminosides, quinolones, et sulfamides) selon les recommandations de la CA-SFM (196).

Méthode

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 (65).

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

6-Recherche phénotypique de la production des BLSE

Cette recherche a été effectuée par deux méthodes :

6.1-Milieu chromogène ESBL (Biomérieux)

Ce milieu assure l'isolement direct et l'identification fiable et rapide des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu. Il est entre autres destiné au dépistage des patients colonisés par des bactéries multi-résistantes responsables d'infections nosocomiales. Grâce à l'introduction de substrats chromogènes, ces milieux combinent l'isolement et l'identification des micro-organismes cibles en une seule étape, ce qui permet de raccourcir le temps de rendu du résultat. Ils sont d'une grande simplicité d'utilisation : il suffit d'observer la couleur des cultures et de noter le résultat. Le substrat chromogène contenu dans chaque milieu spécifique permet de distinguer chaque type de colonie par couleur ; les colonies de *K.*

pneumoniae productrices de BLSE se distinguent par une couleur verte sur le milieu ESBL (Biomérieux) (122).

Méthode

- Deviser la boîte du milieu ESBL(Biomérieux) en compartiments,
- Sous PSM et à l'aide d'une onse prélever une colonie de la bactérie à tester,
- Ensemencer la bactérie par strie dans un compartiment,
- Ensemencer dans un compartiment une souche déjà vérifiée BLSE+ comme témoin positif et une autre souche BLSE- comme témoin négatif.
- Incuber 18 à 24h à 37°C.

Lecture et interprétation des résultats

- L'absence d'une culture désigne une bactérie BLSE-.
- La présence d'une culture verte désigne une *K. pneumoniae* BLSE+.

6.2-Test de synergie

La détermination des phénotypes de la BLSE se fait par la détection des substrats préférentiels de cette enzyme ; elle se réalise en recherchant les éventuelles images de synergie en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » qui peuvent apparaître, sur gélose, entre les molécules d'amoxicilline-ac-clavulanique et une céphalosporine de troisième génération (72). La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme. Les disques d'antibiotiques suivants: l'amoxicilline-ac-clavulanique (AMC), la ceftazidime (CAZ), la cefotaxime (CTX), la ceftriaxone (CRO) et l'aztreonam (ATM) sont placés sur la gélose Mueller Hinton selon le schéma ci-dessous. La distance entre deux disques est de 30 mm centre à centre. L'incubation des boîtes se fait 18 à 24h à 37°C (147).

Après incubation, le résultat est décrété positif si on assiste à une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque contenant la céphalosporine de 3^{ème} génération, en direction du disque porteur d'acide clavulanique par rapport à la zone d'inhibition d'une céphalosporine seule, qui indique la présence d'une BLSE (Figure 7).

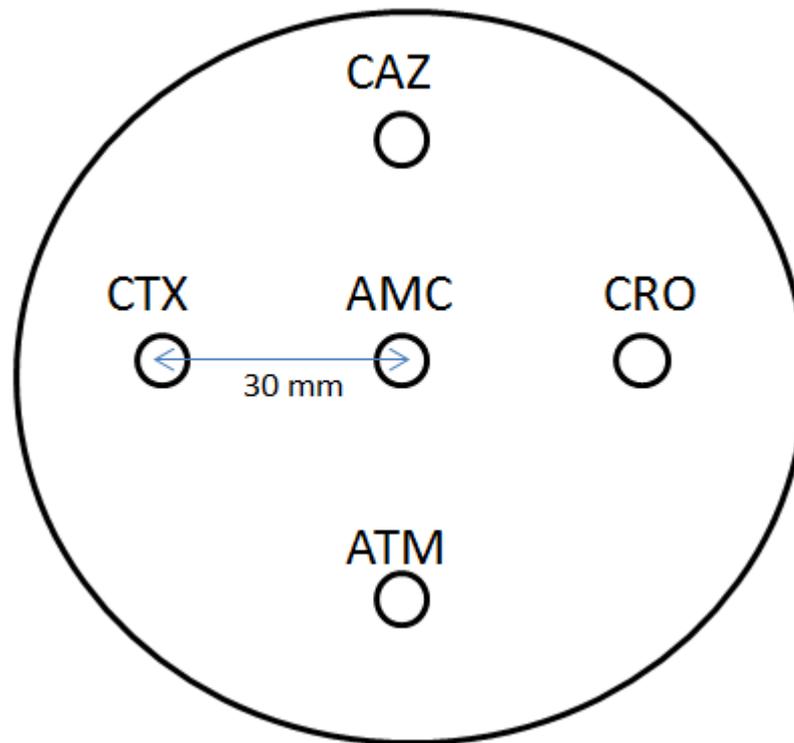


Figure 7 : Schéma explicatif du dépôt des disques d'antibiotiques.

CTX : cefotaxime, CRO : ceftriaxone, ATM : aztreonam, CAZ : ceftazidime,
AMC : amoxicilline-acide clavulanique.

7-Recherche moléculaire des β -lactamases

7.1-L'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN total des 80 souches de *K. pneumoniae* BLSE+ a été réalisée à l'aide du kit Qiagen : mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les conditions spécifiées par les fournisseurs :

- Pipeter 20 μ l de Protéase QIAGEN (ou la protéinase K) est le mettre dans un tube à Eppendorf de 1.5 ml.
- Ajouter 200 μ l d'échantillon (suspension bactérienne) dans le tube Eppendorf
- Ajouter 200 μ l de Buffer AL (tampon) à l'échantillon. Mixer (vortex) pendant 15 s. afin d'assurer une lyse efficace. Il est essentiel que l'échantillon et le Buffer AL soient bien mélangés pour obtenir une solution homogène.
- Incuber ce mélange pendant 30 min à 70°C.
- Centrifuger 1min à 13000 rpm le tube Eppendorf de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes à l'intérieur du couvercle

- Après ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon et mélanger à nouveau en vortexant pendant 15 s. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 1min à 13000 rpm.
- Transvaser soigneusement le mélange du tube Eppendorf dans de la colonne QIAamp Mini [la colonne contient un tube avec filtre qui est placé dans un tube collecteur (fourni) 2 ml] sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min. Ensuite jeter le contenant du tube collecteur.
- Ouvrir la colonne QIAamp Mini et ajouter 500 µl de Buffer (tampon) AW1 sans mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min. Après la centrifugation jeter le contenu dans un tube collecteur (fourni) contenant le filtrat.
- Ajouter 500 µl du Buffer (tampon) AW2 dans la colonne QIAamp Mini, fermer le capuchon et centrifuger à vitesse maximale (20000 x g; 14000 rpm) pendant 3 min.
- Placer la colonne QIAamp Mini filtre dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml (non fourni) et jeter l'ancien tube collecteur (fourni) contenant l'effluent. Centrifuger à fond, accélérer pendant 1 min. Cette étape permet d'éliminer le risque de tampon AW2 report possible.
- Placer la colonne QIAamp Mini spin dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml (non fourni) et jeter le tube contenant le filtrat.
- Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp Mini rotation et ajouter 200 µl de tampon AE ou d'eau distillée. Incuber à température ambiante (15-25°C) pendant 1 min, puis centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min.
- Récupérer le contenu de l'Eppendorf qui est de l'ADN extrait. Puis jeter la colonne QIAamp Mini spin. L'incubation de la colonne QIAamp Mini chargée de tampon AE ou d'eau pendant 5 min à température ambiante avant centrifugation augmente généralement le rendement d'ADN.

7.2-PCR standard

Les réactions d'amplification des gènes codant pour les β-lactamases ont été réalisées avec des couples d'amorces spécifiques illustrés dans le tableau 9. Achaque réaction de PCR standard nous avons utilisé un ADN d'une souche produisant le gène à tester comme témoin positif.

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la

fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir une réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes. (i) Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simples brin ; (ii) borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ; (iii) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

La PCR Standard a été utilisée pour l'identification des β -lactamases de classe A d'Ambler ; *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PE}, *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}.

Matériel

- Plaque de PCR
- Thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cycler Tc9600-G 1002066)
- Mélange réactionnel (Tableau 8)
-

Tableau 8: Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards

Composants	Quantité PCR standard
Quantitect Probe PCR Master Mix Qiagen	12.5 μ l
Amorce Forward	0.5 μ l
Amorce Reverse	0.5 μ l
ADN à amplifier	5 μ l
H2O UP	6.5 μ l
Volume total	25 μ l

Méthode

Après avoir préparé la quantité suffisante du mélange réactionnel (décrit dans le tableau ci-dessus) pour l'amplification des échantillons, 25 µl de ce mélange sont mis dans chaque puits de la plaque pour thermocycleur. La plaque contenant le mélange réactionnel est introduite dans le thermocycleur.

L'amplification PCR standard comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec 1 min à 94°C (dénaturations), 50 secondes à 55°C (appariement des amorces, température variable selon le T_m des amorces) et 1 min 30 secondes à 72°C (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 7 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

Tableau 9: Amorces utilisées pour les PCR standard et le séquençage

Gène	Nom de l'amorce	Séquence	Taille de l'amplicon (bp)	Référence
<i>bla_{TEM}</i>	TEM F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	840	(76)
	TEM R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla_{CTX}</i>	CTX F	TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA	544	(22)
	CTX R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV F	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1051	(214)
	SHV R	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC		
<i>bla_{PER}</i>	PER F	GTAGTATCAGCCCAATCCCC	738	(136)
	PER R	CCAATAAAGGCCGTCCATCA		
<i>bla_{VEB}</i>	VEB F	GGAACAACCTTTGACGATTGA	374	(136)
	VEB R	CCCTGTTTTATGAGCAACAA		
<i>bla_{GES}</i>	GES F	GAAAAAGCAGCTCAGATCG	597	(136)
	GES R	CAACAACCCAATCTTTAGGA		
<i>bla_{ampC}</i>	ampC F	ACAGAGGAGCTAATCATGCG	1243	(97)
	ampC R	GTTCTTTTAAACCATATAACC		
<i>aac(3)-Ia</i>	aac(3)-Ia F	GACATAAGCCTGTTCCGTT	372	(151)
	aac(3)-Ia R	CTCCGAACTCACGACCGA		
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395	(151)
	aac(6')-Ib R	CCCGCTTTCTCGTAGCA		
<i>aadA</i>	aadA F	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812	Cette étude
	aadA R	TTGTACGGCTCCGCAGTG		
<i>ant(2')-I</i>	ant(2')-I F	GACACAACGCAGGTCACATT	524	(113)
	ant(2')-I R	CGCATATCGCGACCTGAAAGC		
<i>aph(3')-VI</i>	aph(3')-VI F	CGGAAACAGCGTTTTAGA	716	(151)
	aph(3')-VI R	TTCCTTTTGTGTCAGGTC		
<i>armA</i>	armA F	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	590	(113)
	armA R	TCTCTTCCATTCCCTTCTCC		
<i>rmtA</i>	rmtA F	CTAGCGTCCATCCTTTCCCTC	634	(113)
	rmtA R	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC		
<i>rmtG1</i>	rmtG1 F	YSCTBTGCCCGGATAACCGT	470	Cette étude
	rmtG1 R	CTRCGSGTGGGRAAGCTGAC		
<i>rmtG2</i>	rmtG2 F	RTSACCGSYGCGTTCATGAC	200	Cette étude
	rmtG2 R	TTCAGCCCGCASGCSAGATC		
<i>rmtC</i>	rmtC F	CTGTACGACGTGTAAGTACTGAGAG	380	Cette étude

	rmtC R	CCCATCGATCCCACCAATATAA		
<i>rmtE</i>	rmtE F	AGAGAGATTAGGCGACATTGAAG	420	Cette étude
	rmtE R	CGGGAACCTCGTGCAGTAAT		
<i>gyrA</i>	gyrA F	AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT	344	(156)
	gyrA R	GCCATACCTACGGCGATAACC		
<i>parC</i>	parC F	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAA	300	(156)
	parC R	TTAAGTTGTCCTTGCCATTCA		
<i>qnrA</i>	qnrA F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543	(207)
	qnrA R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA		
<i>qnrB</i>	qnrB F	GACAGAAACAGGTTCCACCGGT	469	(207)
	qnrB R	CAAGACGTTCCAGGAGCAACG		

F : *Forward* (directe), R : *Reverse* (inverse), rmtG1 (A, B, F), rmtG2 (D1, D2, G).

7.2.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 0,5%. La migration se fait pendant 25 minutes sous un voltage de 135V.

▪ **Technique de préparation du gel d'agarose**

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.
- Ajouter la Solution de bromure d'éthidium BET diluée (12.5 µl pour 50 ml gel d'agarose chauffé) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.
- Laisser refroidir jusqu'à solidification du gel.

▪ **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE X0.5 (le gel doit être totalement émergé).
- Déposer 4µl du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019)] dans le premier puits.
- Mélanger 4 µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du Blue Juice
- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif et un témoin positif
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (environ 25 min).
- Une fois la migration finie, Placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

▪ **Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le poids moléculaire du gène et celle du témoin positif.

7.3-PCR en temps réel

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

Dans notre travail, la PCR en temps réel est réalisée uniquement afin de détecter la présence du nouveau gène codant pour une carbapénèmase *bla_{NDM-1}*. Le couple d'amorce utilisé est montré dans le tableau 11. Nous avons utilisé l'ADN de la souche *Kpnasey* comme témoin positif (67).

Matériel

- Plaque de PCR
- Thermocycleur Taqman (Stratagene MX 3000P)
- Mélange réactionnel (Tableau 10)

Tableau 10: Composition du mélange réactionnel pour la PCR en temps réel

Composants	Quantité PCR en temps réel
Quantitect Probe PCR Master Mix	10 µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
Sonde	0.5 µl
ADN à amplifier	5 µl
H2O UP	3,5 µl
Volume total	20 µl

Méthode

Le mélange réactionnel (décrit dans le tableau ci-dessus) est déposé dans la plaque pour thermocycleur (20 μ l dans chaque puits), cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

L'amplification par PCR en temps réel est programmée comme suit :

Température	50°C	95°C	95°C	60°C	45°C	4°C
Temps	2 min	15 min	1sec	35 sec	30sec	∞

Tableau 11: Amorces et sonde fluorescente utilisées pour la PCR en temps réel

Gène	Nom de l'amorce	Séquence	Taille de l'amplicon (bp)	Référence
<i>bla_{NDM-1}</i>	NDM1 F	GCGCAACACAGCCTGACTTT	155	(67)
	NDM1 R	CAGCCACCAAAAGCGATGTC		
	NDM1-sonde	FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA		

F : *Forward* (directe), R : *Reverse* (inverse).

7.4-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.

Cette technique est une PCR abortive au cours de laquelle sont introduits des acides nucléiques modifiés (ddNTP) dont l'incorporation aléatoire va bloquer la réaction de polymérisation ; les quatre bases sont marquées par un fluorochrome différent. La taille des fragments abortifs obtenue est déterminée à l'aide d'un séquenceur de leurs tailles comme une électrophorèse classique, mais il présente l'avantage d'être couplé à une caméra qui détecte, en temps réel, le fluorochrome fixé à la dernière base incorporée. L'étude de succession des acides nucléiques marqués permet l'obtention de la séquence du fragment d'ADN étudié.

Une PCR Big Dye est réalisée en utilisant le protocole décrit dans le tableau 12. Les produits de cette réaction sont ensuite purifiés en utilisant du Sephadex. Cette méthode est basée sur la purification par chromatographie d'exclusion pour piéger des ddNTP libres en excès qui sont de bas poids moléculaires sur une colonne Sephadex. Les produits purifiés sont séquencés en utilisant le séquenceur Automate ABI 3730.

Les séquences sont ensuite analysées avec le logiciel Codon Code Aligner. La séquence ainsi corrigée est comparée par BlastN avec la banque de donnée Genbank, NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- **Purification**

Matériel

- Plaque à filtre
- Eau Ultra-pure (UP)
- Pompe sous vide
- Agitateur secoueur de microplaques (Heidolph)

Méthode

- Dans une plaque à filtre, mettre le produit de PCR (PCR Standard) + 175 µl d'eau Ultra-pure (UP).
- Filtration sous vide (20 min)

- Ajouter 50µl d'eau UP.
- Agiter 20 min

PCR BigDye

Matériel

- Plaque pour Thermocycleur
- Thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cycler)
- Mélange réactionnel (Tableau 12)

Tableau 12: Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye

Composants	Quantité PCR Big Dye
Buffer	3 µl
Mix BigDay	2 µl
Amorce	1 µl
ADN à amplifier	4 µl
H2O	10 µl
Volume total	20 µl

Méthode

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite.

Une fois le mélange réactionnel est préparé (Tableau12), un volume de 20µl est mis dans chaque puits de la plaque puis introduit dans le thermocycleur.

L'amplification pour la PCR BigDye est programmée en 25 cycles comme suit :

Température	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Temps	5 min	10 s	5s	3 min	∞

▪ **Purification par Sephadex**

Matériel

- Plaque à filtre
- Plaque pour séquençage
- La poudre Sephadex
- Eau Ultra-pure (UP)
- Centrifugeuse

Méthode

- Mettre la poudre Sephadex dans la plaque à filtre + 300µl d'eau UP et laisser 2 à 3 heures.
- Mettre une plaque en dessous de la plaque à filtre pour récupérer l'eau après centrifugation. (l'eau est jetée par la suite).
- Centrifuger à 1200 rpm pendant 2min à 10°C.
- Mettre le produit de la PCR Big Dye dans la plaque à filtre + une plaque en dessous pour récupérer le produit centrifugé (plaque pour séquençage).
- Centrifuger à 1200 rpm pendant 2min à 10°C.
- Récupérer le produit centrifugé destiné à séquencer.

Méthode du séquençage

- Remplir les fiches pour séquençage
- Préparer la plaque pour le séquençage (mettre le support).
- Mettre la plaque dans le séquenceur Automate ABI 3730
- Lancer le séquençage.

7.4.1-Analyse des séquences ADN

La correction et l'analyse des séquences brutes obtenues ont été faites par le logiciel codon code aligner.

Comparer les séquences *via* internet avec les séquences homologues retrouvées dans la banque informatique internationale « Gen Bank » en utilisant soit le BLSATN (séquence nucléotidique) qui compare les bases azotées de l'ADN ou le BLASTP (séquence protéique) qui compare les acides aminés de la protéine traduite. Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage de

similarité de la souche à étudier avec les espèces les plus proches pour déterminer leur affiliation génétique.

Après le BLAST on peut construire des arbres phylogéniques des gènes étudiés à l'aide du logiciel MEGA 5 selon la méthode du « Neighbor-joining »

8-Recherche moléculaire de la résistance associée

Toutes les amorces utilisées dans la PCR standard et leurs références sont montrées dans le tableau 9.

8.1-Résistance aux aminosides

Plusieurs gènes codant pour les enzymes modifcatrices des aminosides ont été amplifiés par PCR standard : les acétyltransférases *aac(3)-Ia* et *aac (6')-Ib*, les nucléotidyltransférases *ant (2'')-I a* et *aadA*, et les phosphotransférases *aph (3')-VI*.

D'autres gènes qui codent pour les 16S ARNr méthytransférases ont été amplifiés par PCR standard: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD1*, *rmtD2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* et *rmtH*.

8.2-Résistance aux quinolones

La résistance aux quinolones est analysée en amplifiant les gènes *qnrA* et *qnrB*.

9- Conjugaison et transfert de la résistance

La conjugaison est une méthode utilisée par les bactéries afin de s'échanger des informations génétiques. Elle consiste en une transmission de plasmides de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse.

Le transfert entre les organismes donneurs et accepteurs de plasmide se fait en quatre grandes étapes :

- Reconnaissance entre donneur (F+) et accepteur (F-) grâce au pilli
- Transfert d'un des deux brins du plasmide
- Synthèse du brin complémentaire chez l'accepteur
- Recirculisation du plasmide chez l'accepteur

Les expériences de conjugaison ont été réalisées dans le but de montrer la nature plasmidique des supports des BLSE et le 16S ARNr méthytransférase et leurs transférabilité.

Nous avons pris cinq souches de *K.pneumoniae* qui portent les deux gènes (CTX-M-15 et armA) pour confirmer la notion du co-tranfert des gènes de BLSE et du gène de résistance aux aminosides. Ces souches ont été utilisées comme donneurs putatifs pour utilisation dans un essai de conjugaison selon la méthode de conjugaison en bouillon.

La conjugaison a été réalisée en utilisant comme souche réceptrice la souche *Escherichia coli J53* (appelée aussi F- ou Azi R) est une dérivé de *E. coli* K-12 qui est résistante seulement à l'azide (l'azoture de sodium) et sensible à tous les antibiotiques.

Les tranconjugants ont été sélectionnées sur gélose de Lauria Bertani (LB) aditionnée de l'azide de sodium (200µg/ml) et de la céfotaxime (16µg/ml) et l'amikacine (100µg/ml).

Matériel

- Antibiotiques : céfotaxime et amikacine en poudre
- Azide en poudre
- Eau distillée
- Bouillon TSB
- LB agar
- autoclave
- Pipettes graduées
- Balance à précision
- Matériel nécessaire pour antibiogramme et CMI (E.Test)
- Matériel nécessaire pour PCR standard et séquençage
- Souche *Ecoli j53*

Méthode

Jour 1 (J1)

Ensemencer la souche *E coli j53* réceptrice et les souches *K. pneumoniae* donatrices en milieu Mac Conkey et incuber 24 heures à 37°C pour avoir des cultures jeunes le lendemain.

J2

- Ensemencer la souche réceptrice et les souches de *K. pneumoniae* donatrices en bouillon TSB et incuber 4 heures à 37°C (pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne) avec agitation.

- Après l'incubation, réaliser un mélange donatrices réceptrices dans un rapport 1/10 (1ml de bactéries donatrices+ 9ml de bactéries réceptrices) à fin d'optimiser le contact
- mélanger doucement 2 à 3 fois
- incuber 18 à 24 heures à 37°C sans agitation

J3

- Préparer les boîtes des milieux sélectifs en incorporant à une gélose LB l'azide, la cefotaxime et l'amikacine à des concentrations finales de 200µg/ml ,16 µg/ml et 100µg/ml
- Ensemencer par épuisement le mélange sur la moitié des boîtes de sélection (figure 8)
- Vérifier la sélectivité des milieux utilisés en ensemençant par spot (ou par dépôt de 4µl à l'aide d'une micropipette) la souche donatrice et la souche réceptrice dans l'autre moitié.
- Incuber 24 heures à 37°C.

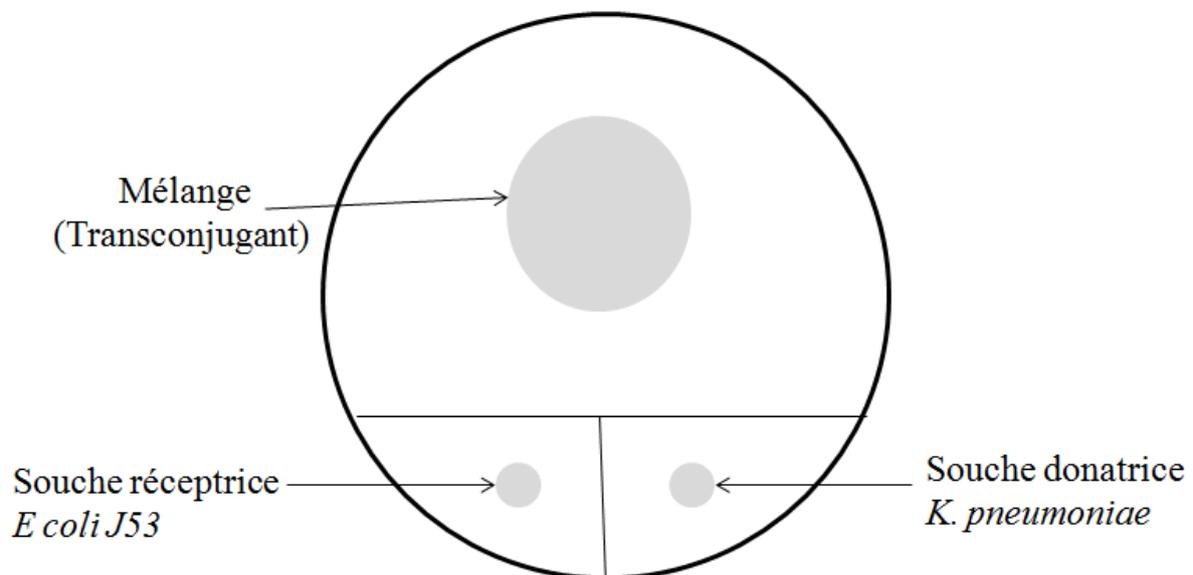


Figure 8: Schéma explicatif de la disposition des souches sur le milieu sélectif.

J4

- Après incubation, identifier la culture du transconjugant par MALDI-TOF-MS.
- Faire un antibiogramme du transconjugant et de la souche donatrice selon les recommandations de la CA-SFM

- Déterminer la CMI de la céfotaxime, la gentamicine et l'Amikacine des transconjugants par E.test

J5

- Vérifier le transfert de la résistance entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice en comparant les deux antibiogrammes et les CMI des deux antibiotiques.
- Vérifier le transfert des gènes de résistance par Biologie Moléculaire en réalisant une PCR standard des gènes CTX-M et armA codants pour la résistance aux β -lactamines et aux aminosides et leur séquençage.

10. Typage moléculaire des souches : *Multi-locus sequence typing* (MLST)

Le MLST est une technique standardisée et discriminante, actuellement appliquée dans des études macro-épidémiologiques (internationales) ou phylogénétiques qui fournit des données claires et utiles pour caractériser les relations génétiques entre les souches bactériennes.

Le MLST compare les séquences de gènes codant pour des enzymes métaboliques (gènes domestiques d'évolution lente) afin de mesurer la distance génétique entre les différentes souches. La technique de MLST des *Klebsiella pneumoniae* a été développée et mise au point par *Diancourt et al* en 2005 (66). Cette méthode est basée sur le séquençage des 7 *housekeeping genes* (gènes de ménage) importants dans le métabolisme de la bactérie (tableau 13). Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques à chaque espèce.

L'alignement des séquences d'un locus donné permet de repérer les allèles différents entre eux par des mutations et/ou recombinaisons pour chaque souche bactérienne. La combinaison des allèles obtenus à partir de chaque locus sélectionné permet de définir une séquence type (ST), représentant un génotype multi-locus. Ces séquences types avec les allèles qu'elles définissent sont consultables dans les bases de données du site web :

<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>.

Tableau 13: Caractéristiques des 7 gènes utilisés en MLST (69)

Locus	Fonction du gène	localisation (pb)	taille (pb)
<i>rpob</i>	beta-subunit of RNA polymerase	4,771,502–4,772,002	501
<i>gapA</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,347,540–1,347,091	450
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	4,004,045–4,003,569	477
<i>pgi</i>	phosphoglucose isomerase	4,831,091–4,831,522	432
<i>phoE</i>	phosphorine E	320,309–320,728	420
<i>infB</i>	translation initiation factor 2	3,937,568–3,937,885	318
<i>tonB</i>	periplasmic energy transducer	2,394,251–2,394,664	414

*pb : paire de base

Pour tester la relation clonale entre les souches de *K. pneumoniae* par MLST nous avons utilisé le protocole numéro 2 qui est un protocole simplifié qui utilise des amorces de séquençage universelles ce qui permet de séquencer les gènes avec les mêmes amorces directes et inverses avec la même température de PCR (tableau 14).

Tableau 14: Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage

PCR	rpoB F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA
	rpoB R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC
	gapA F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG
	gapA R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT
	mdh F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG
	mdh R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCAGCAGCAG
	pgi F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC
	pgi R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT
	phoE F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG
	phoE R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT
	infB F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG
	infB R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGAACTTC
	tonB F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACTCGGTACATCAGGTT
	tonB R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCAATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG
Séquençage	F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	R	TTGTGAGCGGATAACAATTC

F : *Forward* (directe), R : *Reverse* (inverse)

Partie 3 : Résultats et discussion

Résultats

Notre étude a porté sur 100 souches de *Klebsiella pneumoniae* collectées durant une période de deux ans (2010 et 2011), à partir de prélèvements bactériologiques à visée diagnostique reçus au laboratoire central de Microbiologie du CHU Dorban d'Annaba. La fréquence d'isolement des souches de *K. pneumoniae* par rapport au nombre total de bactéries isolées de patients hospitalisés dans le CHU d'Annaba qui s'est étalée durant les deux ans de l'étude est de 8.2%.

1-Identification et origine des souches de *K. pneumoniae* isolées

L'identification des 100 souches cliniques de *K. pneumoniae* par système Api 20E (Biomérieux, Meylan, France) répond réellement aux profils numériques spécifiques à l'espèce *K. pneumoniae*. Une seconde technique par spectrométrie de masse MALDI-TOF-Microflex a confirmé l'identification par Api 20E des 100 souches de *K. pneumoniae* isolées et elle a donné de très bons scores allant de 1.90 à 2.35 (Tableau 15).

Tableau 15: Provenance des 100 souches de *K. pneumoniae* isolées et leurs scores MALDI-TOF-MS.

Référence des souches	Nature de prélèvement	Age	Sexe	Service	Scores MALDI-TOF
Kp1	sang	3 ans	M	pédiatrie	[1,96 - 2,30]
Kp2	sang	4 mois	F	pédiatrie	[1,90 - 2,23]
Kp3	LCR	10 mois	M	pédiatrie	[2,29 - 2,35]
Kp4	sang	1mois	F	pédiatrie	[2,07 - 2,31]
Kp5	sang	14mois	F	pédiatrie	[1,99 - 2,29]
Kp6	sang	1 an	F	pédiatrie	[1,92 - 2,15]
Kp7	LCR	2mois	M	pédiatrie	[1,97 - 2,28]
Kp8	LCR	1 an	M	pédiatrie	[1,91 - 2,16]
Kp9	LCR	15 jours	M	pédiatrie	[2,16 - 2,25]
Kp10	sang	73 ans	M	ORL	[1,99 - 2,14]
Kp11	sang	4 mois	M	pédiatrie	[2,06 - 2,22]
Kp12	sang	14mois	F	pédiatrie	[1,95 - 2,21]
Kp13	sang	2 ans	M	pédiatrie	[1,91 - 2,09]
Kp14	sang	4mois	F	pédiatrie	[1,90 - 2,07]
Kp15	sang	4mois	F	pédiatrie	[1,91 - 2,26]
Kp16	sang	18 mois	F	pédiatrie	[2,12 - 2,32]
Kp17	sang	3 ans	F	pédiatrie	[1,94 - 2,24]
Kp18	sang	5mois	F	pédiatrie	[1,96 - 1,99]
Kp19	sang	7 jours	M	pédiatrie	[2,02 - 2,37]
Kp20	sang	13 ans	F	réanimation médicale	[1,96 - 2,06]
Kp21	sang	4 jours	F	pédiatrie	[2,12 - 2,33]
Kp22	LCR	1 mois	M	pédiatrie	[2,28 - 2,36]
Kp23	urine	36 ans	M	endocrinologie	[2,12 - 2,34]
Kp24	urine	22 ans	M	réanimation médicale	[1,90 - 2,30]
Kp25	sang	2 mois	M	pédiatrie	[2,23 - 2,35]
Kp26	urine	42 ans	F	endocrinologie	[2,24 - 2,30]
Kp27	urine	64 ans	F	endocrinologie	[2,28 - 2,30]
Kp28	urine	23 ans	F	urgences	[2,16 - 2,32]
Kp29	urine	81 ans	M	endocrinologie	[2,05 - 2,31]
Kp30	urine	23 ans	F	hématologie	[1,96 - 2,11]
Kp31	urine	2mois	F	pédiatrie	[1,99 - 2,25]
Kp32	urine	17 jours	M	pédiatrie	[1,96 - 2,31]
Kp33	urine	83 ans	M	endocrinologie	[1,90 - 2,22]
Kp34	urine	57 ans	F	pneumologie	[1,99 - 2,30]
Kp35	urine	2 mois	M	pédiatrie	[2,07 - 2,31]
Kp36	urine	34 ans	F	psychiatrie	[2,11 - 2,98]
Kp37	urine	30 ans	F	hématologie	[2,01 - 2,35]
Kp38	urine	20 jours	M	pédiatrie	[1,97 - 2,22]
Kp39	urine	22 ans	M	urgences	[2,12 - 2,34]
Kp40	urine	1 an	F	pédiatrie	[2,05 - 2,31]
Kp41	urine	1mois	M	pédiatrie	[1,97 - 2,30]
Kp42	urine	48 ans	F	endocrinologie	[2,19 - 2,32]
Kp43	urine	49 ans	F	urgences	[2,29 - 2,36]

Kp44	urine	51 ans	M	urgences	[1,96 - 2,25]
Kp45	urine	29 ans	F	réanimation médicale	[2,27 - 2,32]
Kp46	urine	63 ans	F	endocrinologie	[1,90 - 2,32]
Kp47	urine	5 mois	F	pédiatrie	[1,99 - 2,33]
Kp48	urine	28 ans	F	urgences	[2,07 - 2,31]
Kp49	urine	76 ans	F	néphrologie	[1,99 - 2,25]
Kp50	urine	60 ans	M	urgences	[1,97 - 2,35]
Kp51	urine	15 ans	F	urgences	[1,90 - 2,30]
Kp52	urine	4 ans	F	pédiatrie	[1,92 - 2,85]
Kp53	urine	31 ans	F	urgences	[2,11 - 2,36]
Kp54	urine	60 ans	F	endocrinologie	[1,97 - 2,22]
Kp55	urine	60 ans	M	urgences	[1,96 - 2,30]
Kp56	urine	63 ans	F	endocrinologie	[2,16 - 2,32]
Kp57	urine	5 ans	f	pédiatrie	[1,96 - 2,47]
Kp58	urine	2 ans	M	pédiatrie	[2,25 - 2,35]
Kp59	urine	48 ans	M	urgences	[2,10 - 2,23]
Kp60	urine	58 ans	f	infectieux	[2,02 - 2,32]
Kp61	PPD	28 ans	F	réanimation médicale	[2,25 - 2,35]
Kp62	pus	8 jours	F	urgences	[1,91 - 2,22]
Kp63	PPD	20 ans	F	pédiatrie	[2,22 - 2,33]
Kp64	pus	3 ans	F	pédiatrie	[1,90 - 2,24]
Kp65	aspiration respiratoire	53 ans	M	ORL	[1,90 - 2,30]
Kp66	pus	60 ans	M	endocrinologie	[2,11 - 2,31]
Kp67	PPD	2 ans	M	pédiatrie	[2,07 - 2,34]
Kp68	aspiration respiratoire	50 ans	F	ORL	[1,99 - 2,23]
Kp69	PVT cutané	1 an	M	pédiatrie	[1,96 - 2,32]
Kp70	pus	2mois	F	pédiatrie	[1,90 - 2,13]
Kp71	pus	2mois	M	pédiatrie	[2,11 - 2,30]
Kp72	pus	3 ans	F	pédiatrie	[2,19 - 2,31]
Kp73	aspiration respiratoire	21 ans	M	pneumologie	[1,98 - 2,13]
Kp74	pus	40 ans	M	endocrinologie	[1,97 - 2,23]
Kp75	PPD	6 jours	M	pédiatrie	[2,02 - 2,25]
Kp76	pus	6 jours	M	endocrinologie	[1,99 - 2,31]
Kp77	pus	61 ans	M	endocrinologie	[1,92 - 2,32]
Kp78	aspiration respiratoire	76 ans	F	ORL	[1,90 - 2,31]
Kp79	pus	76 ans	F	ORL	[2,00 - 2,20]
Kp80	pus	39 ans	F	hématologie	[2,10 - 2,31]
Kp81	pus	51 ans	M	néphrologie	[2,20 - 2,30]
Kp82	pus	3 mois	F	pédiatrie	[1,91 - 2,23]
Kp83	PPD	55 ans	M	réanimation médicale	[1,92 - 2,33]
Kp84	Sonde urinaire	88 ans	F	infectieux	[2,21 - 2,33]
Kp85	pus	35ans	F	urgences	[1,96 - 2,24]
Kp86	pus	31ans	F	endocrinologie	[2,21 - 2,24]
Kp87	PPD	2 mois	M	pédiatrie	[1,96 - 2,27]
Kp88	pus	1 mois	F	pédiatrie	[1,90 - 2,30]
Kp89	pus	59 ans	F	endocrinologie	[1,90 - 2,25]
Kp90	pus	59 ans	F	Infectieux	[1,97 - 2,00]
Kp91	pus	35 ans	M	endocrinologie	[2,16 - 2,23]
Kp92	pus	58 ans	M	urgences	[2,01 - 2,33]
Kp93	PPD	5 ans	M	pédiatrie	[2,11 - 2,22]

Kp94	PPD	6 jours	F	pédiatrie	[1,90 - 2,28]
Kp95	pus	69 ans	F	Endocrinologie	[1,92 - 2,35]
Kp96	pvt cutané	2 ans	F	pédiatrie	[1,97 - 2,14]
Kp97	pus	20 jours	M	pédiatrie	[1,90 - 2,29]
Kp98	pus	5 ans	M	pédiatrie	[2,21 - 2,35]
Kp99	pus	3 mois	M	pédiatrie	[2,16 - 2,30]
Kp100	pus	43 ans	M	ORL	[2,00 - 2,31]

M : Masculin, F : Féminin, pvt : prélèvement, PPD : prélèvement distale protégé, ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

1.1-Distribution des souches de *K. pneumoniae* dans les différents produits pathologiques.

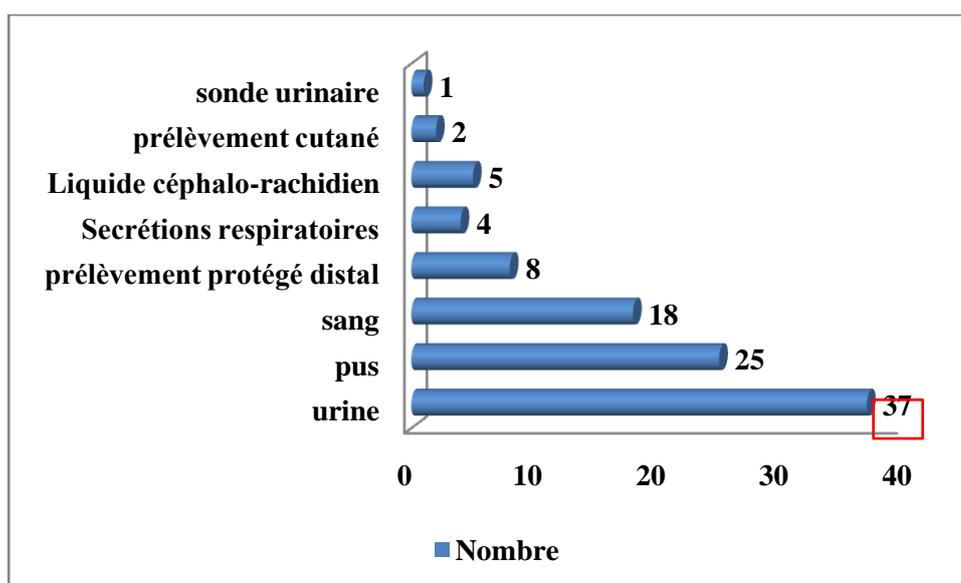


Figure 9: Distribution des souches de *K. pneumoniae* dans les différents produits pathologiques

Parmi les 100 souches de *K. pneumoniae* isolées dans les différents produits pathologiques, 37 ont été diagnostiquées dans les urines (37%), 25 dans les prélèvements de pus (25%), 18 dans les hémocultures (18%), et 8 des prélèvements protégés distaux (8%).

1.2- Répartition des patients infectés par l'espèce *K. pneumoniae* selon le sexe

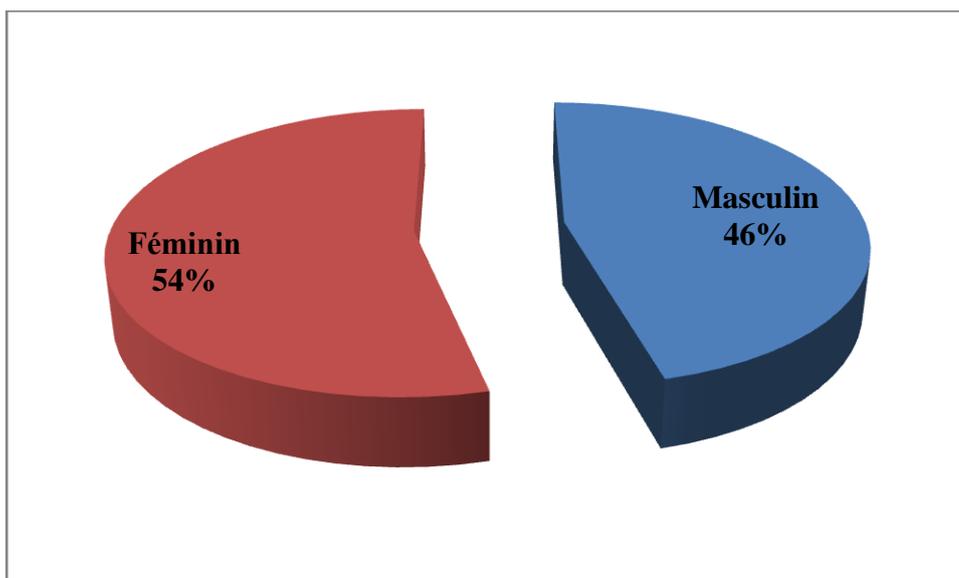


Figure 10: Répartition des patients infectés par l'espèce *K. pneumoniae* selon le sexe

Au total, 100 patients infectés par la bactérie *K.pneumoniae* sont concernés par cette étude, 46 (46%) hommes et 54 (54%) femmes. Le sexe ratio est de 0.85.

1.3- Répartition des patients infectés par l'espèce *K. pneumoniae* selon l'âge

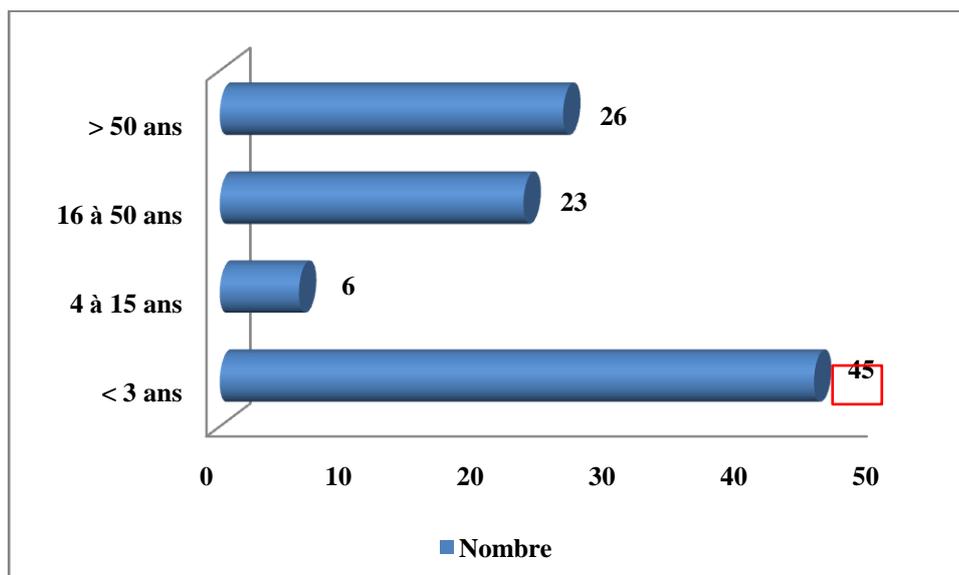


Figure 11: Répartition des patients infectés par l'espèce *K. pneumoniae* selon l'âge

Toutes les tranches d'âges sont touchées par les infections à *K. pneumoniae*, avec des extrêmes d'âge variant entre 4 jours et 81 ans. La tranche d'âge qui semble la plus touchée par les infections à *K. pneumoniae* dans notre étude est la population des enfants de moins de trois ans (45%) suivi par la population des personnes âgées (26%).

1.4-Distribution des souches de *K. pneumoniae* dans les différents services d'hospitalisation

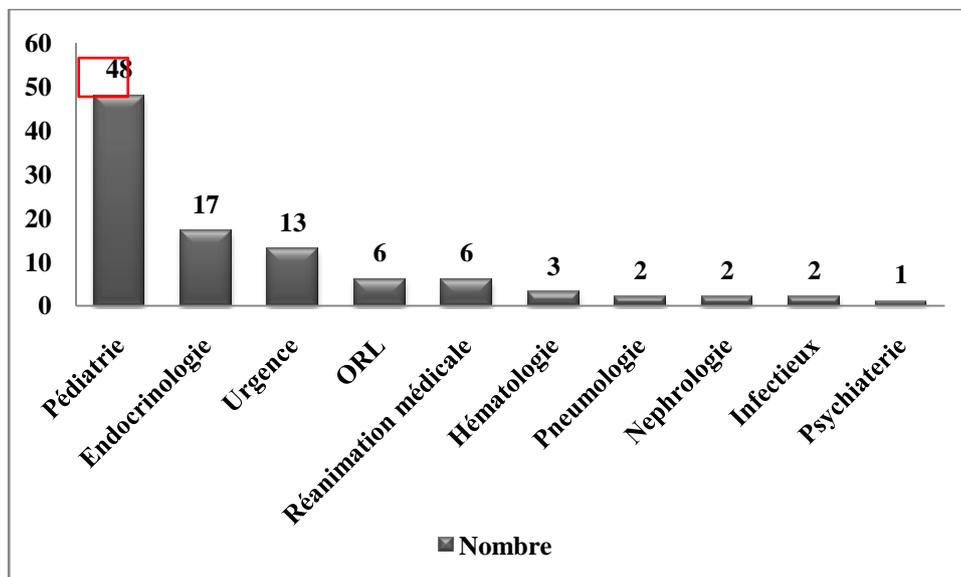


Figure 12: Distribution des souches de *K. pneumoniae* dans les différents services d'hospitalisation

Le service de pédiatrie qui regroupe également le service de réanimation pédiatrique et la néonatalogie semble être le plus incriminé car 48% de souches proviennent de ce service, suivi par le service d'endocrinologie (17%) et du service d'urgence (13%).

2-Biotypage

2.1-Biotypage des souches de *K.pneumoniae* selon les profils numériques en API 20E

Sur les 100 souches de *K.pneumoniae* isolées des différents services hospitaliers des CHU d'Annaba, cinq profils numériques différents sont enregistrés parmi lesquels, le profil 521 5773 est prédominant car on le retrouve dans 60 souches, soit une fréquence de 60%, suivi du profil numérique 520 5773 pour (uréase -) dans 18 (18%) souches et le profil 521 4773 pour (VP -) qu'on retrouve dans 10 (10%) souches. Le profil 521 5573 pour (inositol -) a été retrouvé chez 9 souches et enfin le profil 520 5573 pour (uréase -, inositol -) retrouvé chez 3 (3%) souches.

La figure 13 montre les fréquences des profils numériques retrouvés.

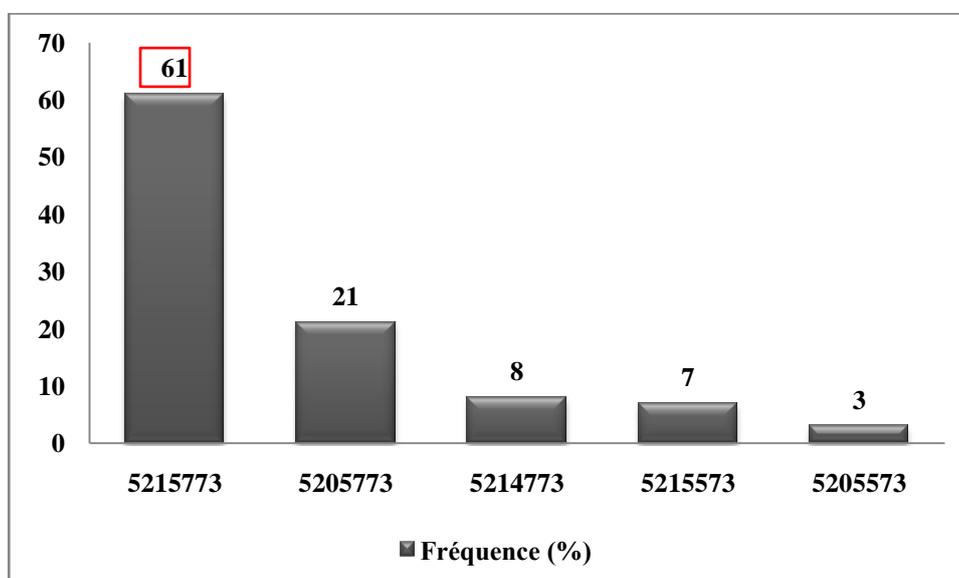


Figure 13: Fréquence des profils numériques en API 20E des 100 souches de *K. pneumoniae*.

2.2-Biotypage des souches de *K. pneumoniae* par MALDI-TOF :

Le MALDI-TOF permet de faire un biotypage des souches de *K. pneumoniae* grâce au logiciel Biotyper qui permet de comparer les spectres du profils protéiques ou scores des bactéries et les rassembler en cluster puis les cluster en clones dans un dendrogramme (figure 14) .On remarque dans notre dendrogramme que les souches de *K. pneumoniae* se sectionnent en 3 clones (A, B et C) après la distance de 500.

Clone A : qui regroupe généralement les souches isolées des enfants hospitalisés en service de pédiatrie.

Clone B : qui regroupe généralement les souches isolées de personnes âgées hospitalisés en service d'endocrinologie.

Clone C : qui sont généralement les souches isolées d'infections respiratoires et de pus.

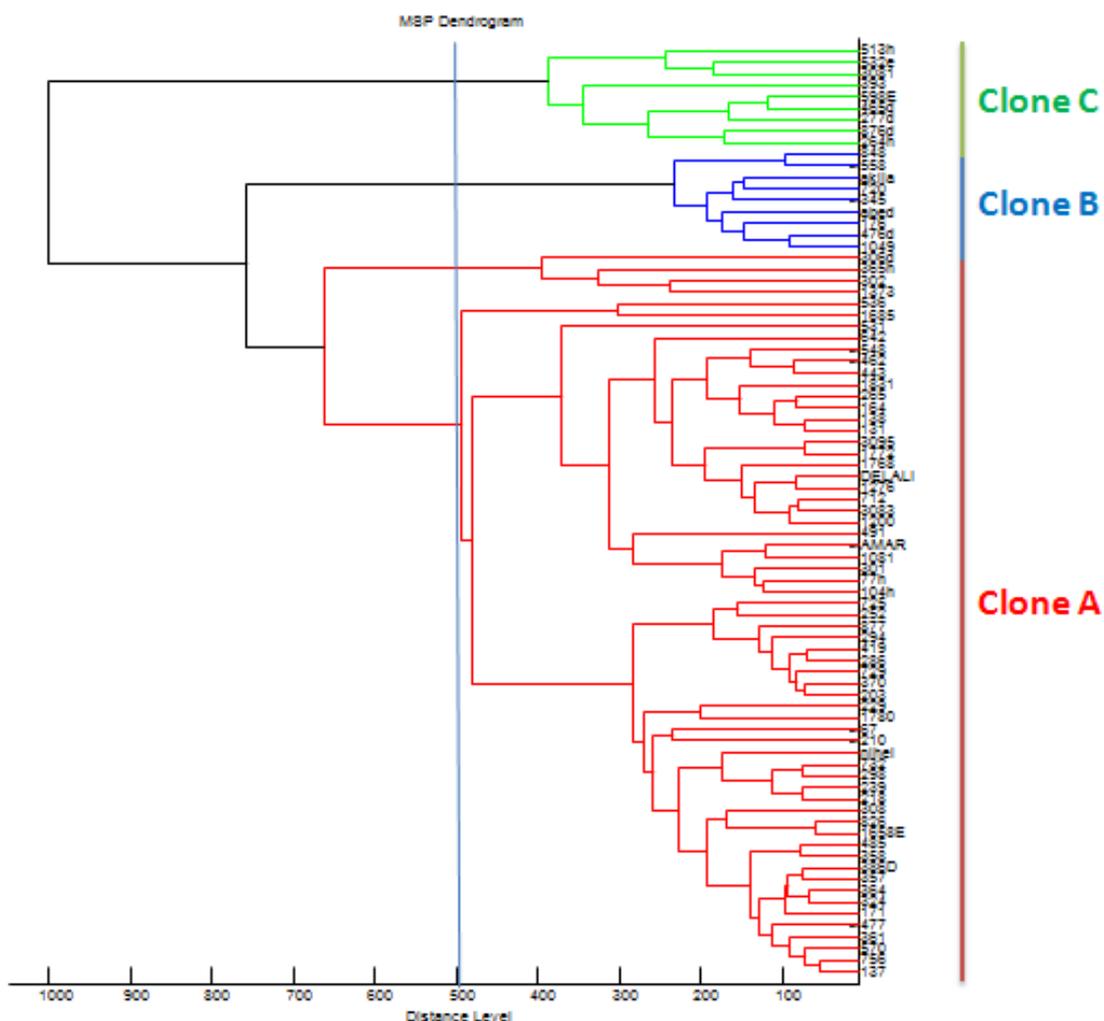
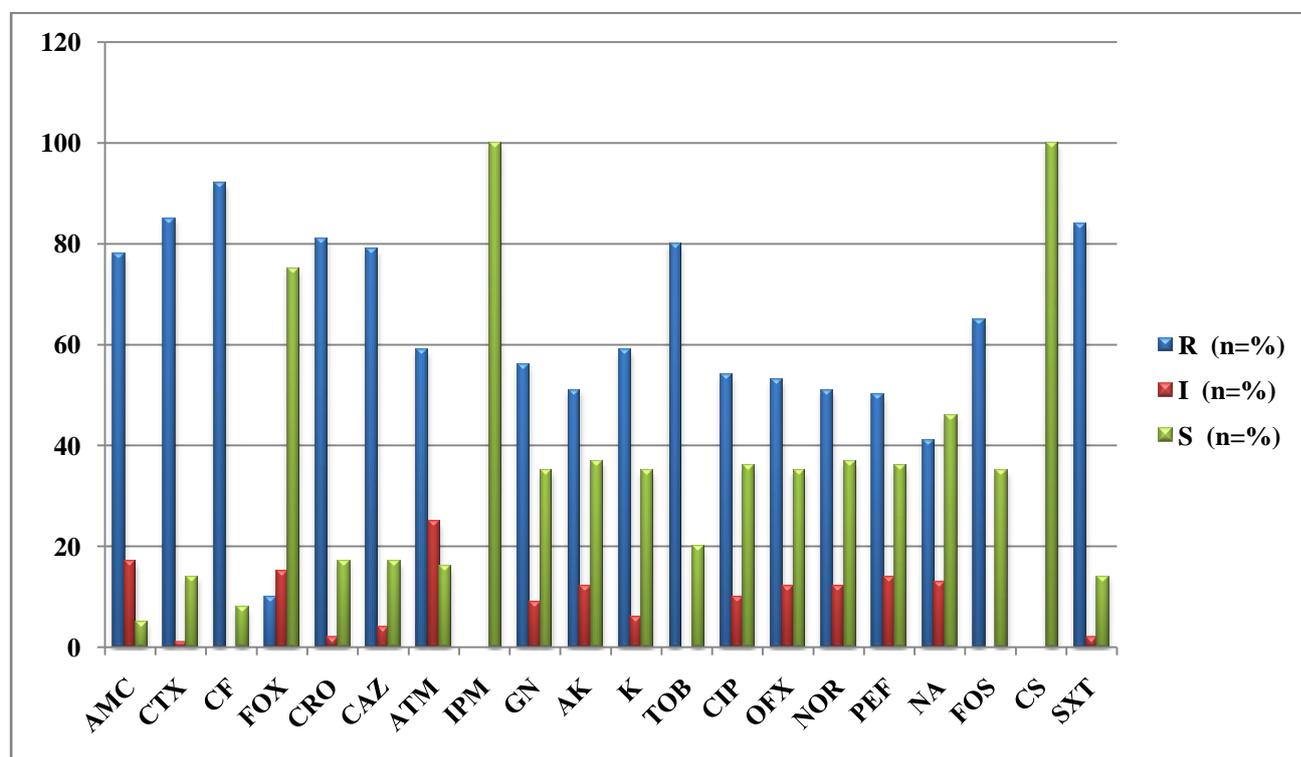


Figure 14: Dendrogramme des souches de *K. pneumoniae* isolées aux CHU d'Annaba

3- Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme sont illustrés dans la figure 15 et la figure 16.

K. pneumoniae résiste naturellement à l'ampicilline et aux carbénicillines par production de pénicillinase chromosomique. En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des 100 souches de *K.pneumoniae* étudiées, on note une résistance très élevée vis-à-vis des β -lactamines: l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique à hauteur de 78 %, de 91% aux céphalosporines de première génération, de 81% aux céphalosporines de 3ème génération et une faible résistance à la cefoxitine soit 10%. En revanche, toutes les souches (100%) étaient sensibles à l'imipénème et à la colistine. Concernant les aminosides, on observe une résistance assez marquée pour la gentamicine de 56% suivi par 51% pour l'amikacine. Par ailleurs, vis-à-vis des fluoroquinolones, un taux de résistance de 54% a été détecté pour la ciprofloxacine ; quant aux sulfamides, ces derniers restent actifs sur 84% de souches étudiées.



R : résistant, I : intermédiaire, S : sensible.

Figure 15 : Sensibilité aux antibiotiques des 100 souches cliniques de *K. pneumoniae* aux 20 antibiotiques testés.



Figure 16 : Image d'antibiogramme de la souche Kp24

4- Les Phénotypes de résistance de *K.pneumoniae* aux antibiotiques

A fin d'obtenir une meilleure interprétation des résistances bactériennes vis-à-vis des molécules testées, les résultats de l'antibiogramme sont traduits en phénotypes de résistance.

4.1- Phénotypes de résistance aux β -lactamines

Les phénotypes de résistance vis-à-vis des β -lactamines sont illustrés dans le tableau 16.

Tableau 16: Fréquences des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches de *K. pneumoniae* étudiées.

Phénotype de résistance	Fréquence (%)
BLSE	80
PBN	9
PHN	5
CHN	4
PRI	2
Total	100

BLSE: β -lactamases à spectre étendu. PBN : Pénicillinase de bas niveau, PHN : Pénicillinase de haut niveau, CHN : céphalosporinase de haut niveau, PRI : Pénicillinase résistant aux inhibiteurs de β -lactamases.

Cinq phénotypes de résistance aux β -lactamines, dont un sauvage (PBN), sont représentés dans notre étude. Celui des BLSE domine dans 80% des cas, suivi de celui du type sauvage dans 9%, du type PHN dans 5%, du type CHN de 4% et du type PRI plus rare dans 2% des cas.

4.2- Phénotypes de résistance aux aminosides

Les phénotypes de résistance vis-à-vis des aminosides sont illustrés dans le tableau 17.

Tableau 17: Fréquences des phénotypes de résistance aux aminosides des souches de *K. pneumoniae* étudiées.

Phénotype de résistance	Fréquence (%)
Sauvage	20
G	0
T	24
KGT	29
KTA	4
KGTA	23
Total	100

G: gentamicine, T: tobramycine, K: kanamycine, A: Amikacine.

La répartition des phénotypes de résistance aux aminosides montre une prédominance du phénotype KGT avec une fréquence de 29%, suivi du phénotype T avec une fréquence de 24% et le phénotype KGTA avec une fréquence de 23%. Le phénotype sauvage enregistre un taux de 20%. En revanche, on note une faible fréquence du phénotype KTA de 4% et l'absence 0% du phénotype G (résistance isolée à la gentamycine).

4.3- Phénotypes de résistance aux quinolones

Les phénotypes de résistance vis-à-vis des quinolones sont illustrés dans le tableau 18.

Tableau 18: Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones des souches de *K. pneumoniae* étudiées

Phénotype de résistance	Fréquence (%)
Sauvage	36
NA	15
NA NOR PEF	10
NA NOR PEF CIP OFX	39
Total	100

NA : acide nalidixique, NOR : norfloxacin, PEF : pefloxacin, CIP : ciprofloxacine, OFX : ofloxacin.

Le phénotype de la résistance associée entre les quinolones et les fluoroquinolones est le plus fréquent (39%), suivi du phénotype sensible (36%) et du phénotype conférant une résistance isolée à l'acide-nalidixique (15%).

5- Recherche phénotypique des BLSE

5.1- Gélose ESBL (biométrieux)

La recherche des bêta-lactamases à spectre étendu sur gélose ESBL a montré que 80 souches de *K. pneumoniae* ont présenté des colonies de couleur verte, ce qui indique qu'elles sont productrices d'enzyme bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE+) .En revanche, aucune culture n'a été observée sur le milieu ESBL pour les 20 souches restantes (BLSE-) (figure 17).

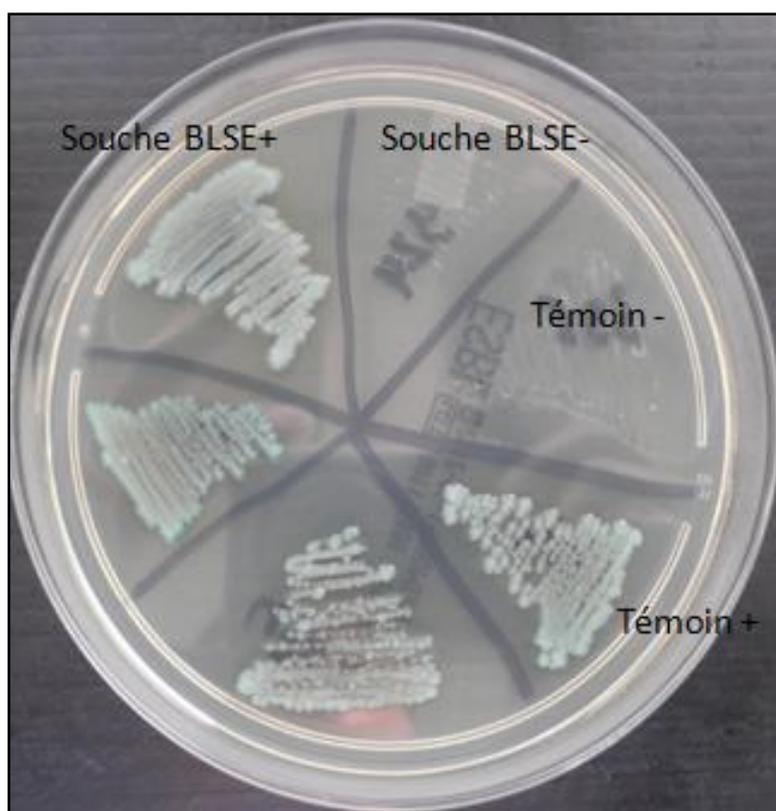


Figure 17: Détection de la production de β -lactamase à spectre étendu sur milieu ESBL Biomérieux.

5.2- Test de synergie

Pour le test de synergie, la lecture des résultats a révélé la présence d'une zone d'élargissement autours des disques en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » entre les disques utilisés chez 68 souches de *K. pneumoniae* indiquant clairement la production de BLSE par ces souches (figure 18). Cependant, l'absence des images de synergie chez les souches restantes peut être expliquée par la sensibilité du test.

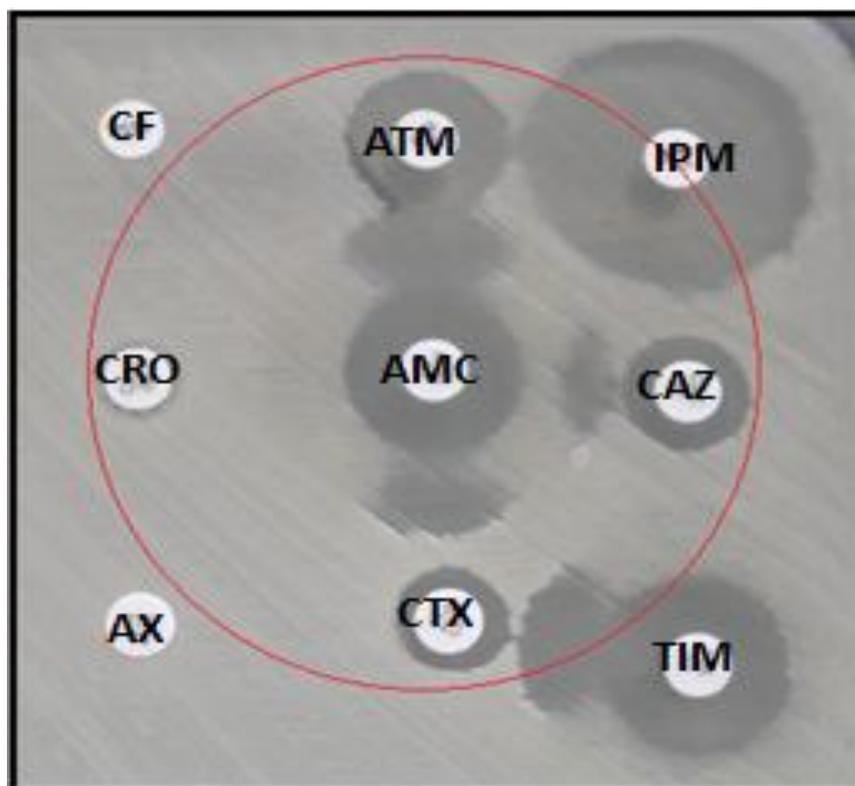


Figure 18: Images de synergie entre les C3G et l'AMC de la souche Kp1.

6-Profiles phénotypiques des souches de *K.pneumoniae* productrices de BLSE (KpBLSE)

6.1- Distribution des souches KpBLSE dans les différents services d'hospitalisation

Tableau 19: Nombre et pourcentage des souches KpBLSE dans les différents services d'hospitalisation

Service	N	%
Pédiatrie	46	95,83
Endocrinologie	10	58,82
Réanimation médicale	6	100
Urgences	6	46,15
ORL	5	83,33
Infectieux	2	100
Hématologie	2	66,66
Pneumologie	1	50
Néphrologie	1	50

N : nombre de souches KpBLSE isolées dans le service, Rapport (%): nombre des souches KpBLSE / nombre de souches de *K.pneumoniae* isolées dans le même service hospitalier.

Les résultats illustrés dans le tableau ci-dessus montrent que la population des KpBLSE varie en fonction des services. Le service de pédiatrie reste de loin le pourvoyeur essentiel de ces souches (95.83%), suivi du service d'ORL avec une fréquence de 83.33% et du service d'endocrinologie soit 58%.

Bien que l'effectif soit réduit Nous signalons que la totalité (100%) des souches isolées en service d'infectieux et de réanimation médicale était productrice de BLSE.

6.2- Distribution des souches KpBLSE dans les différents produits pathologiques

Tableau 20: Nombre et pourcentage des souches KpBLSE dans différents produits pathologiques

Produits pathologiques	N	%
Pus	23	92
Urine	23	62,16
Sang	18	100
prélèvement protégé distal	8	100
Liquide céphalo-rachidien	5	100
prélèvement cutané	2(ER)	100
sonde urinaire	1(ER)	100
Secrétions respiratoires	4	0

N : nombre de souches KpBLSE isolées à partir du produit pathologique,

Rapport (%): nombre des souches KpBLSE / nombre de souches de *K.pneumoniae* isolées à partir du même produit pathologique.

ER : effectif réduit.

La répartition des KpBLSE dans les différents produits pathologiques montre que toutes les souches isolées à partir des prélèvements de sang (100%), des prélèvements protégés distaux (100%) et du liquide céphalo-rachidien étaient productrices de BLSE, suivis directement des prélèvements de pus (92%). En revanche, les prélèvements d'urines enregistrent la fréquence la plus faible de production de BLSE soit 62.16%. Enfin, aucune souche isolée des sécrétions respiratoires n'était révélée productrices de BLSE.

6.3- Corésistance des souches KpBLSE aux antibiotiques

Les taux de résistances des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE sont mentionnés dans le tableau 21

Tableau 21: Nombre et pourcentage des de corésistance des souches KpBLSE aux antibiotiques

Antibiotiques	R n (%)	I n (%)	S n (%)
Amoxicilline+Ac-clavulanique	65 (81,2)	15 (18,75)	00 (00)
Céfoxitine	04 (5)	15 (18,75)	61 (76,25)
Aztreonam	49 (61,25)	24 (30)	07 (08,75)
Imipénème	00 (00)	00 (00)	81 (100)
Gentamicine	54 (67,5)	08 (10)	18 (22,5)
Amikacine	47 (58,75)	10 (12,5)	23 (28,75)
Ciprofloxacine	56 (70%)	10 (12,5)	24 (30)
Ac-nalidixique	36 (45)	11(13,75)	33 (41,25)
Fosfomycine	48 (60)	00 (00)	32 (40)
Colistine	00 (00)	00 (00)	81 (100)
Trimethoprime-Sulfamathexazol	65 (81,25)	00 (00)	15 18,75)

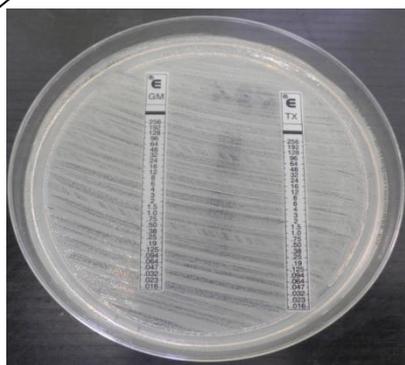
R : résistant, I : sensibilité intermédiaire, S : sensible, n : nombre, % : pourcentage

En analysant les résultats du tableau 16 nous remarquons que les 80 (100%) souches de KpBLSE restent sensibles à l'imipénème et à la colistine.

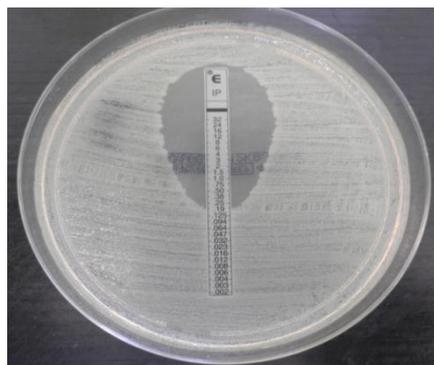
Par contre, ces souches ont exprimé des taux de résistance élevée vis-à-vis de la plupart des autres familles d'antibiotiques particulièrement la Gentamicine (67.5%), l'amikacine (58.75%), la ciprofloxacine (70%) et les sulfamides (81.25%) présentant ainsi un fort risque d'échec thérapeutique.

6.4-Détermination des Concentration minimales inhibitrices (CMI) des souches KpBLSE

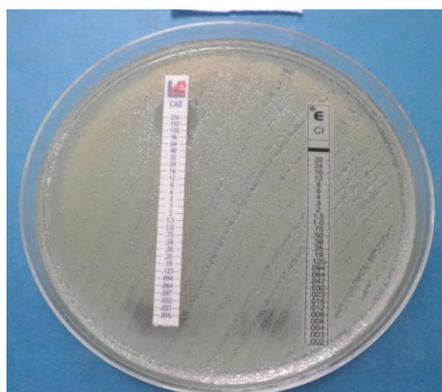
Les 80 souches productrices de BLSE ont montré toutes un niveau de résistance très élevé à tous les β -lactamines. Les CMI de la céfotaxime étaient rangées de 64 à >512 $\mu\text{g/ml}$, la ceftazidime à partir de 32 à >256 $\mu\text{g/ml}$; contrairement à l'imipénème, les souches BLSE+ ont montré de bas niveaux de résistance avec des CMI allant de 0.19 à 2 $\mu\text{g/ml}$. La résistance des souches aux aminosides et aux fluoroquinolones était également remarquable: 54 (67.5%) souches sont résistantes la gentamicine de 32 à > 256 $\mu\text{g/ml}$, 47 (58.75%) à l'amikacine avec des CMI allant de 8 à > 256 $\mu\text{g/ml}$ et 56 (70%) à la ciprofloxacine avec des CMI ragées de 2 à > 32 $\mu\text{g/ml}$. Finalement, 65 (81.25%) des souches de KpBLSE étaient résistantes aux triméthoprim-sulfaméthoxazole avec des CMI qui varient entre 12 et supérieures à 32 $\mu\text{g/ml}$.



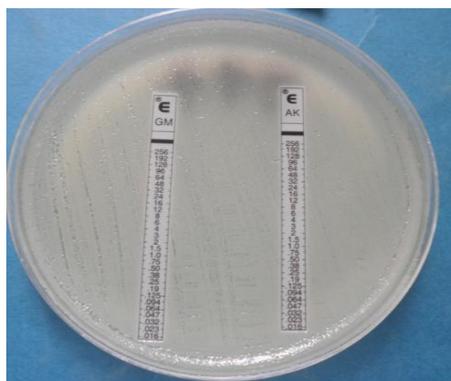
(I)



(II)



(III)



(IV)



(V)

Figure 19: Détermination des CMI de la souche Kp24 par E.Test

(I) E.Test céfotaxime et gentamicine. (II) ETest imipénème , (III) E.Test ceftazidime et ciprofloxacine, (IV) E.Test gantamiciine et amikacine, (V) E.Test trimethoprime sulfamathezazole.

7-Profil moléculaire de la résistance aux β -lactamines des souches KpBLSE

7.1- PCR Standard

L'amplification par PCR standard en utilisant les amorces spécifiques qui codent pour les BLSE et la révélation des gènes par l'électrophorèse en gel d'agarose ont montré que 80 souches de *K. pneumoniae* isolées dans cette étude se sont avérées productrices de moins deux gènes qui codent pour le BLSE.

- Sur les 80 souches de *K. pneumoniae* BLSE+ isolées 76 (95%) des souches possèdent le gène *bla*_{CTX-M} (figure 20).
- 73 (91.25%) souches possèdent le gène *bla*_{SHV} (figure 21).
- 74 (92.5%) souches possèdent le gène *bla*_{TEM} (figure 22).

D'après nos résultats, nous notons qu'aucune souche ne possède le gènes : *bla*_{PER}, *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}.

7.2- PCR en temps réel

L'amplification en temps réel utilisée pour la détection des carbapénèmases a montré que les souches de *K. pneumoniae* étudiées ne possèdent pas le gène *bla*_{NDM-1}.

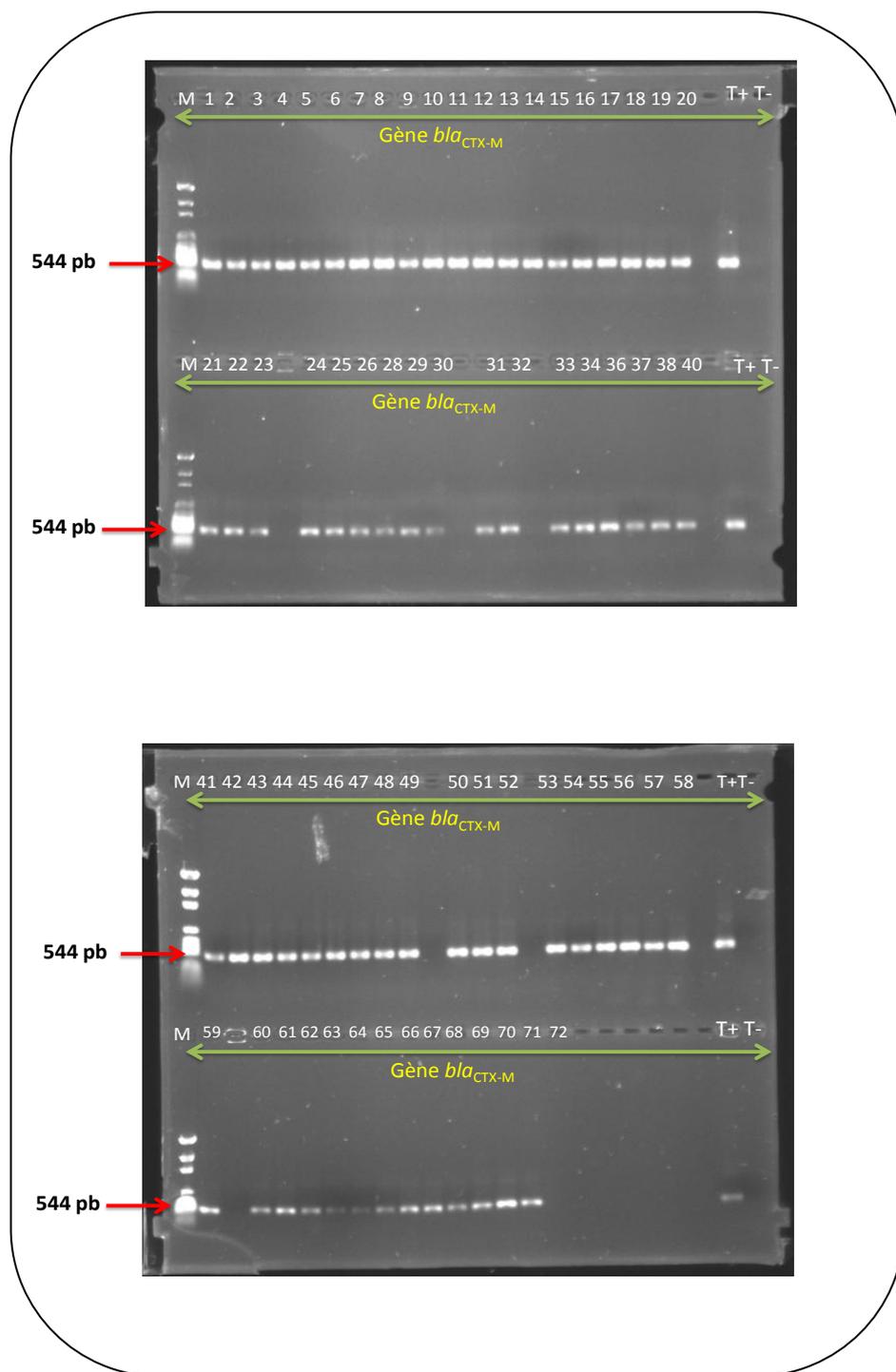


Figure 20 : Electrophorèse sur gel d’agarose 1% des produits d’amplification par PCR du gène *bla*_{CTX-M}.

M : marqueur de tailles de l’ADN, Pb : paire de bases

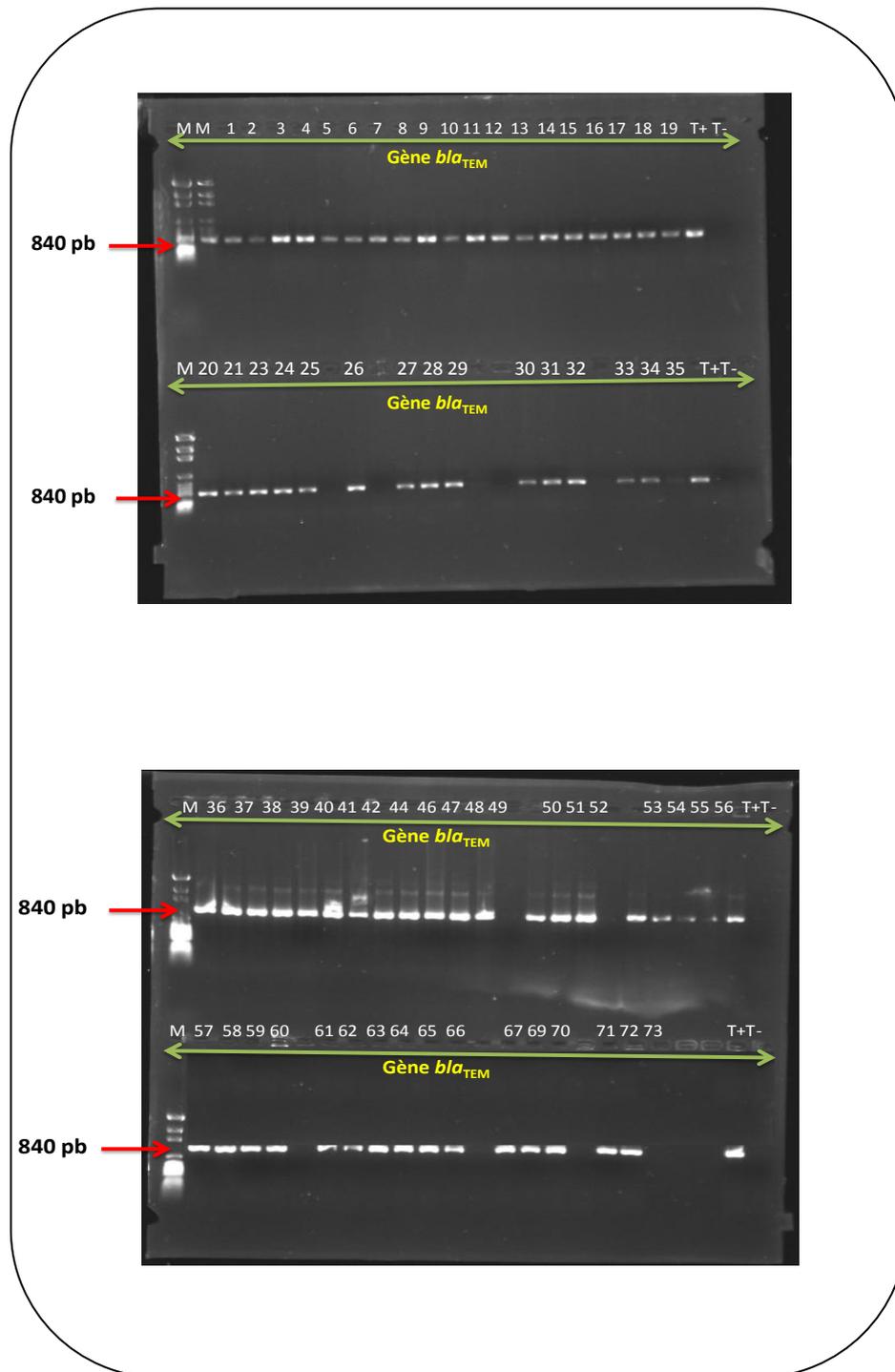


Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla*_{TEM}.

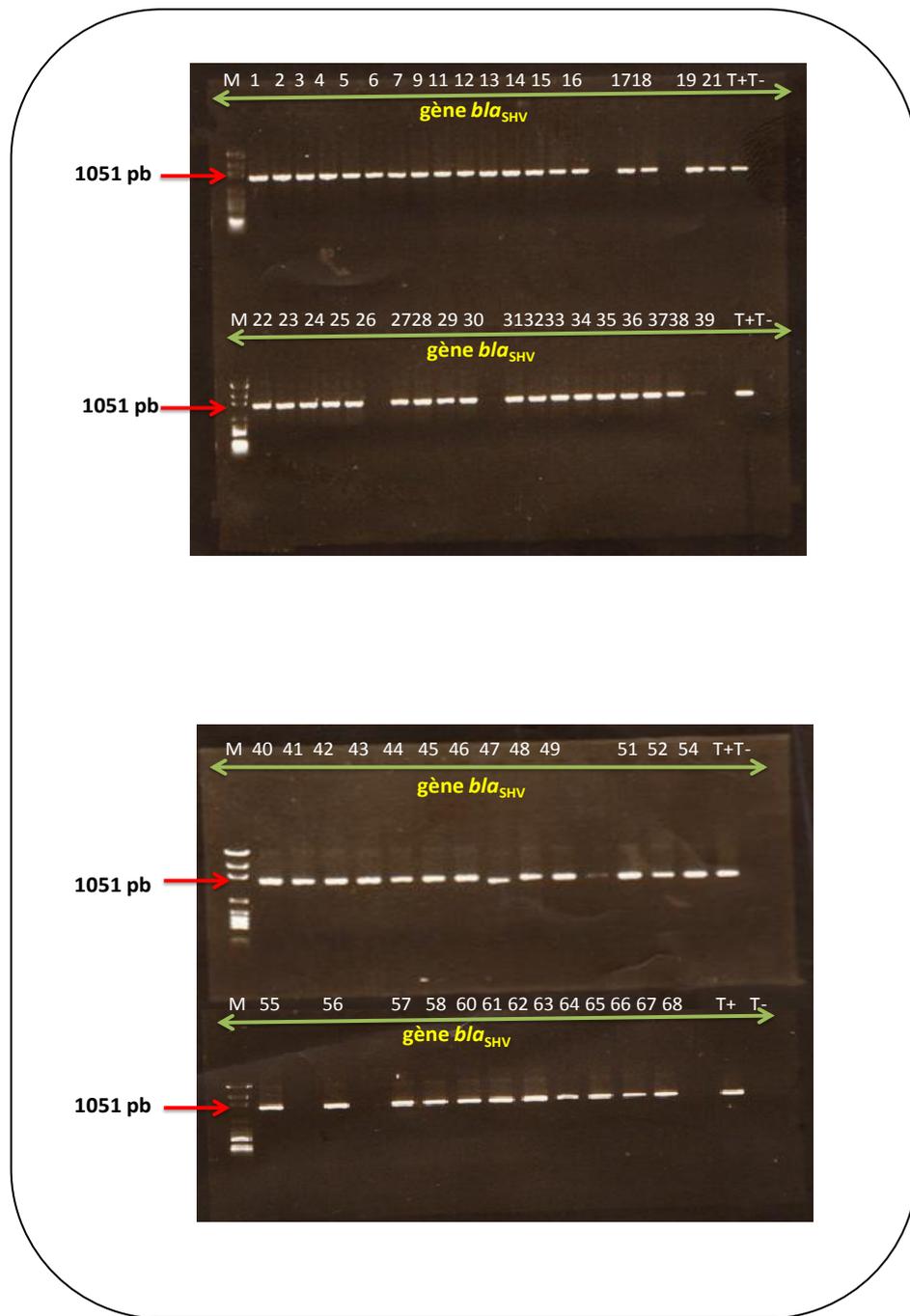


Figure 22 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{SHV}*

7.3- Séquençage et analyse des séquences des gènes qui codent pour les BLSE

Les résultats sont consignés dans le tableau 22.

Après purification et séquençage des produits de PCR positifs, la correction des séquences par codon code aligner et la comparaison des séquences obtenues à la base de donnée NCBI, nous avons identifié plusieurs clusters du gène SHV (SHV-133, SHV-1, SHV-11, SHV-12, SHV-33, SHV-28, SHV-1a, SHV-32, SHV-26, et SHV-2a) des souches de *K.pneumoniae* BLSE+ isolées.

Ces techniques ont également révélé que tous les gènes TEM appartenaient au variant TEM-1, que la majorité des gènes CTX-M appartenaient au gène CTX-15 du groupe 1 et qu'une seule souche possède le gène CTX-M-38 appartenant au groupe 9.

Tableau 22: Profil moléculaire des 80 souches KpBLSE

n	Référence de la souche	Gènes codant pour les BLSE		
1	Kp1	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
2	Kp2	SHV-32	TEM-1	CTX-M-15
3	Kp3	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15
4	Kp4	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
5	Kp5	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
6	Kp6	SHV-12	TEM-1	CTX-M-15
7	Kp7	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
8	Kp8	-	TEM-1	CTX-M-15
9	Kp9	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
10	Kp10	-	TEM-1	CTX-M-15
11	Kp11	SHV-26	TEM-1	CTX-M-15
12	Kp12	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15
13	Kp13	SHV-28	TEM-1	CTX-M-15
14	Kp14	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15
15	Kp15	SHV-12	TEM-1	CTX-M-15
16	Kp16	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
17	Kp17	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
18	Kp18	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
19	Kp19	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
20	Kp20	-	TEM-1	CTX-M-15
21	Kp21	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
22	Kp22	SHV-1	-	CTX-M-15
23	Kp23	SHV-12	TEM-1	CTX-M-15
24	Kp24	SHV-1a	TEM-1	CTX-M-15
25	Kp25	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
26	Kp26	SHV-26	TEM-1	CTX-M-15
27	Kp27	SHV-12	TEM-1	-
28	Kp29	SHV-2a	TEM-1	CTX-M-15
29	Kp31	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
30	Kp32	SHV-12	TEM-1	CTX-M-15
31	Kp33	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
32	Kp34	SHV-2a	TEM-1	CTX-M-38
33	Kp35	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
34	Kp37	SHV-1a	TEM-1	CTX-M-15
35	Kp38	SHV-12	TEM-1	-
36	Kp40	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
37	Kp45	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
38	Kp48	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
39	Kp50	SHV-133	TEM-1	-

40	Kp52	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
41	Kp53	-	TEM-1	CTX-M-15
42	Kp55	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
43	Kp56	SHV-1	-	CTX-M-15
44	Kp57	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
45	Kp58	SHV-28	-	CTX-M-15
46	Kp59	-	TEM-1	CTX-M-15
47	Kp60	SHV-32	TEM-1	CTX-M-15
48	Kp61	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
49	Kp62	SHV-26	TEM-1	CTX-M-15
50	Kp63	SHV-28	TEM-1	CTX-M-15
51	Kp64	SHV-28	TEM-1	CTX-M-15
52	Kp65	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
53	Kp66	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
54	Kp67	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
55	Kp68	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
56	Kp69	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
57	Kp70	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
58	Kp71	-	TEM-1	CTX-M-15
59	Kp72	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
60	Kp75	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
61	Kp79	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15
62	Kp81	-	TEM-1	CTX-M-15
63	Kp82	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
64	Kp83	SHV-133	-	CTX-M-15
65	Kp84	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
66	Kp85	SHV-32	TEM-1	CTX-M-15
67	Kp86	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
68	Kp87	SHV-1	-	CTX-M-15
69	Kp88	SHV-32	TEM-1	CTX-M-15
70	Kp89	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
71	Kp90	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15
72	Kp91	SHV-11	TEM-1	-
73	Kp93	SHV-28	-	CTX-M-15
74	Kp94	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
75	Kp95	SHV-1a	TEM-1	CTX-M-15
76	Kp96	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15
77	Kp97	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15
78	Kp98	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
79	Kp99	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15
80	Kp100	SHV-32	TEM-1	CTX-M-15

7.4-Arbres phylogénétiques

Le logiciel MEGA 5 est un système intégré qui fournit des outils pour effectuer un alignement automatique et manuel, inférer des arbres phylogénétiques, estimer des taux de l'évolution moléculaire, déduire des séquences ancestrales et de tester des hypothèses d'évolution. Son objectif consistait à explorer, découvrir, et analyser l'ADN et les séquences protéiques dans une perspective évolutive.

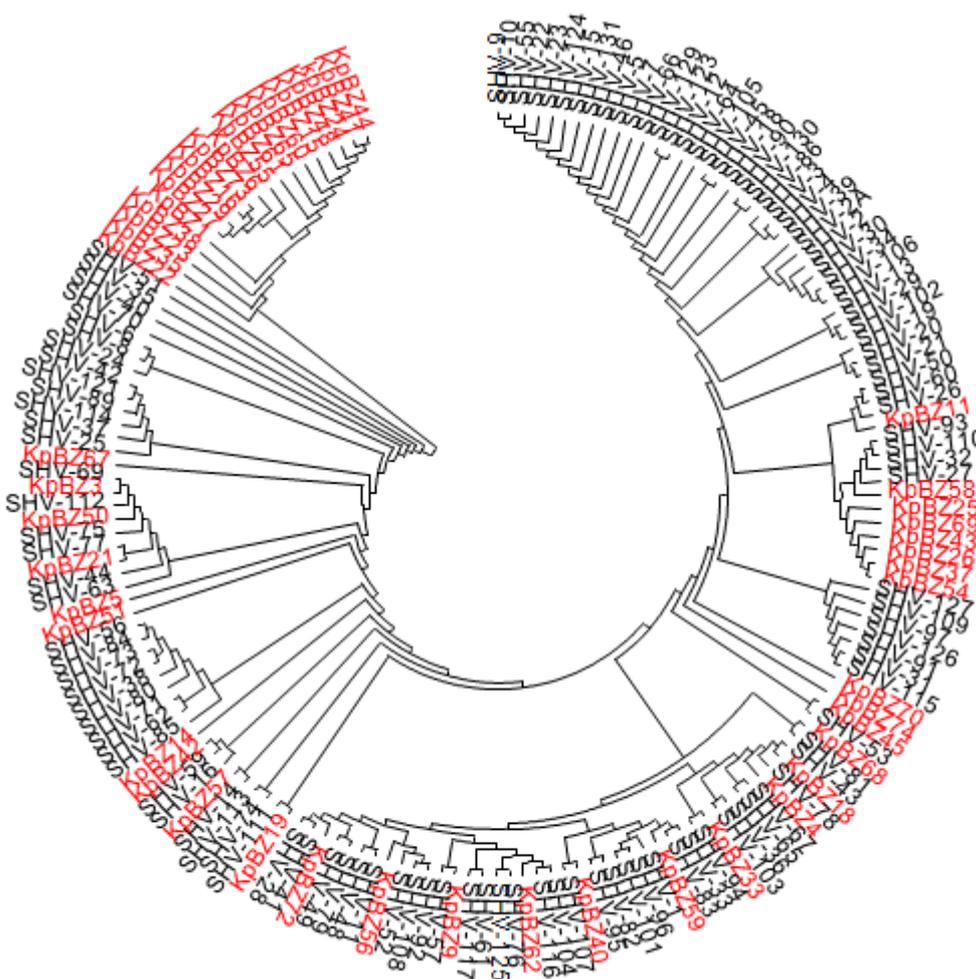


Figure 23:Arbre phylogénétique du gène bla_{SHV}

L'emplacement des souches de KpBLSE isolées dans cette étude sont marquées en rouge par rapport aux séquences universelles des clusters SHV.

8-Recherche moléculaire de la résistance croisée

Les résultats du support génétique de la résistance croisée sont montrés dans le tableau 23

8.1-Résistance aux aminosides

8.1.1- Les enzymes modifcatrices des aminosides

La PCR standard et le séquençage des gènes qui codent pour Les enzymes modifcatrices des aminosides ont fait apparaitre, d'une part la présence de 50 (62.5%) de souches de KpBLSE qui portent le gène *aac(6)-Ib* (figure 25), et d'autre part 35 (43.75%) des souches KpBLSE qui portent le gène *aadA* (31 *aadA2* et 4 *aadA1*) (figure 26). La production simultanée de ces deux gènes a été détectée chez 12 souches de KpBLSE. En revanche, aucune souche des KpBLSE ne possède les gènes *aac(3)-Ia*, *ant (2'')-I* ou *aph (3')-VI*.

8.1.2- Les 16S ARNr methyltransphérases

La PCR et le séquençage ont montré que 23 (28.75%) des souches KpBLSE possèdent le gène *armA* qui code pour le 16s ARNr methyltransférase responsable de la résistance élevée à tous les aminosides. Toutes ces souches ont exprimé de hauts niveaux de CMI (> 256 µg/ml) à l'égard de la gentamicine et également à l'amikacine. (Figure 27).

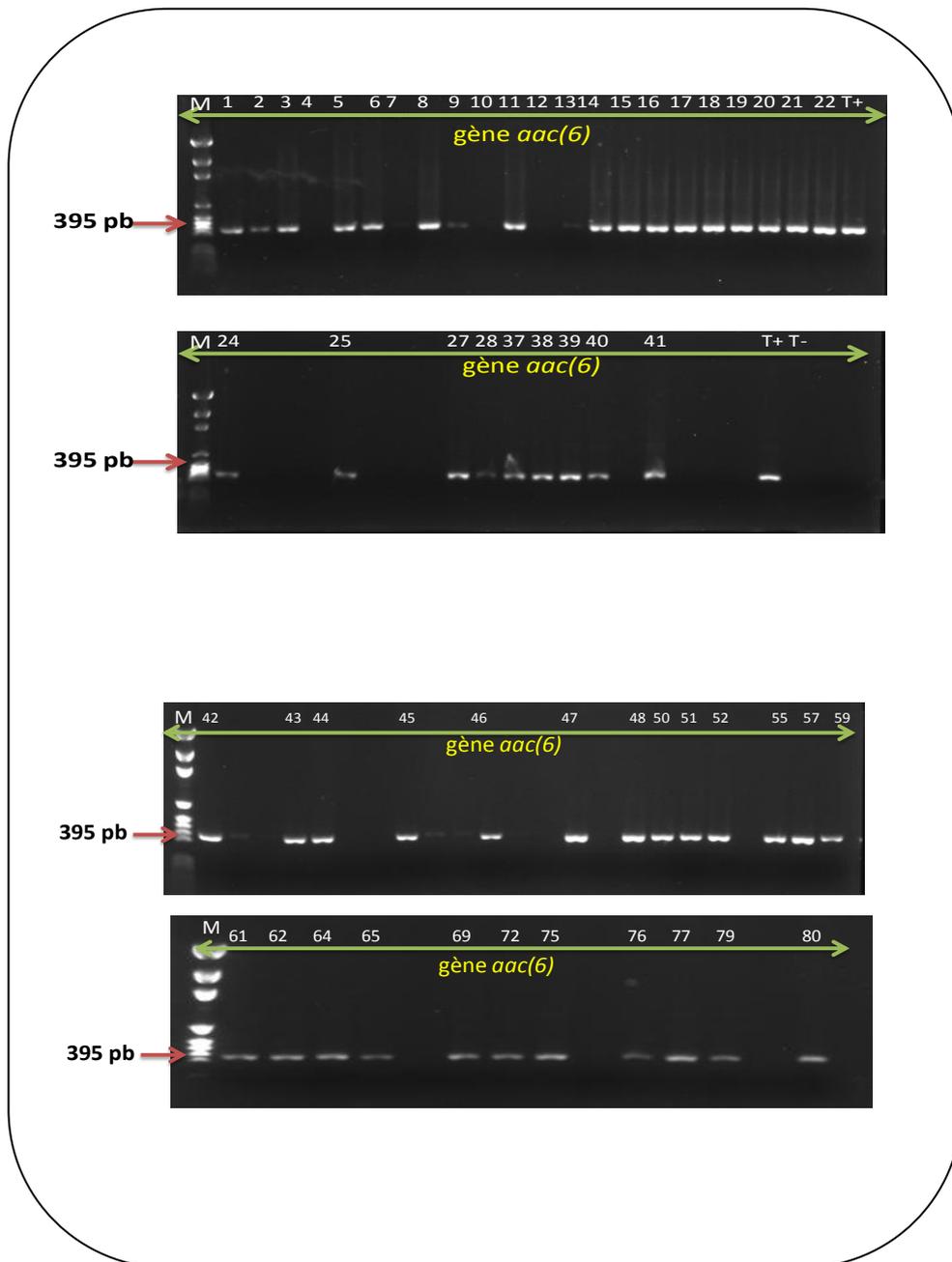


Figure 25: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aac(6')*-Ib.

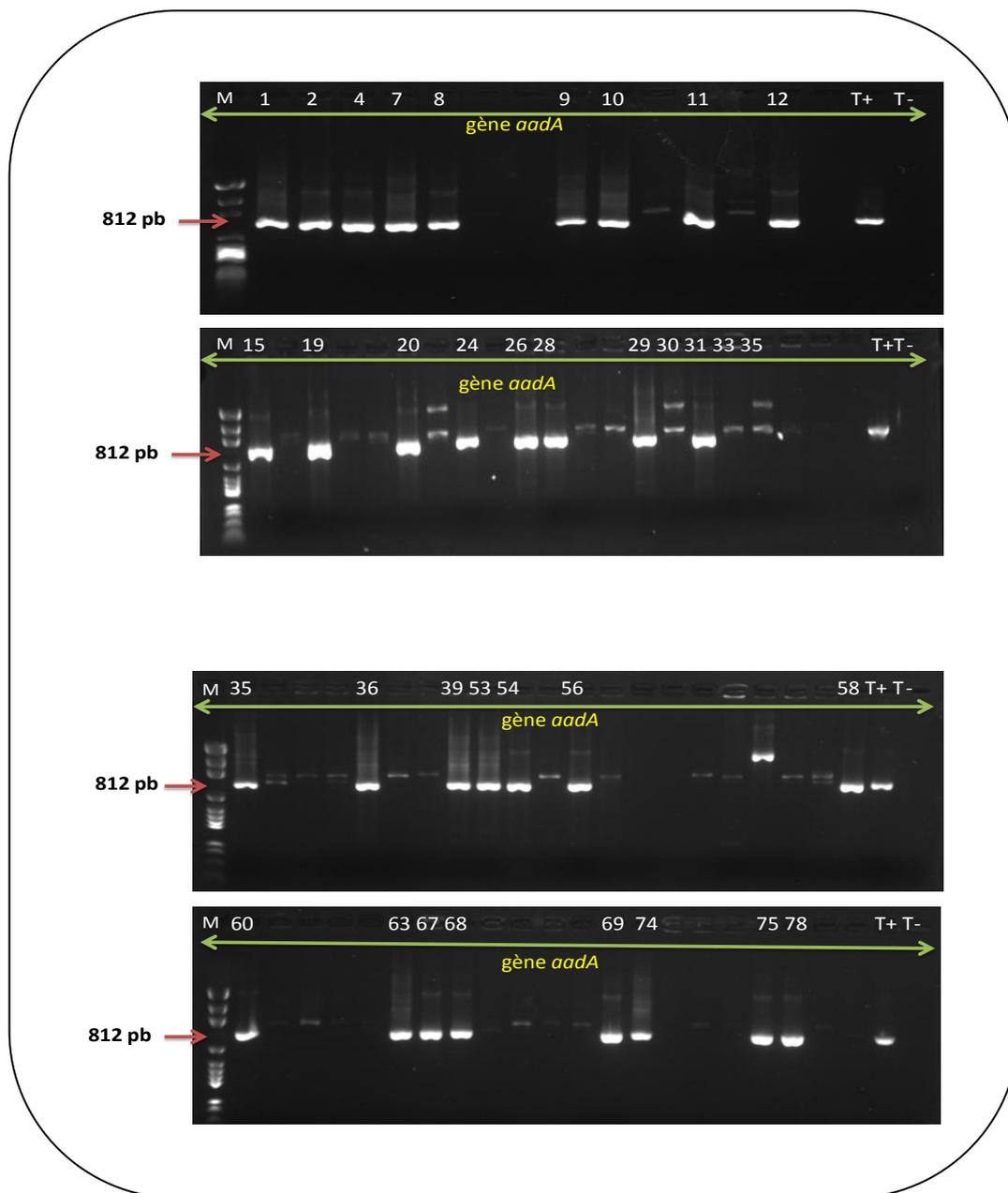


Figure 26: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aadA*.

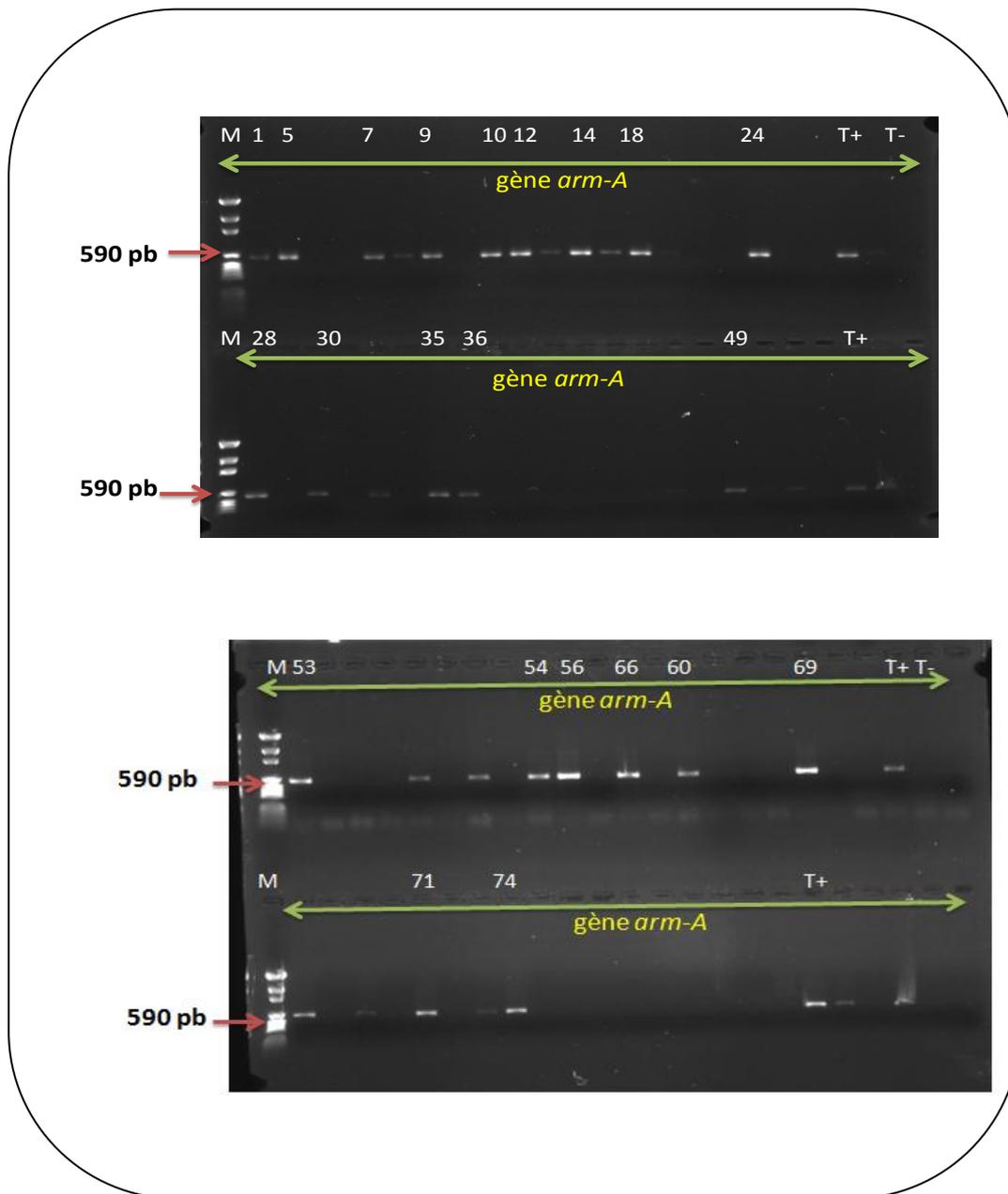


Figure 27: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *armA*.

8.2- Résistance aux quinolones

L'amplification par PCR standard et le séquençage ont montré que 22 (27.5%) des souches KpBLSE isolées dans cette études possèdent le gène *qnrB-42* qui code pour la résistance aux fluoroquinolones (figure28) .le gène *qnrB-42* a toujours coexisté avec le gène *aac(6')-Ib-cr*, ce dernier code pour la résistance simultanée aux aminosides et à la ciprofloxacine. Cependant, aucune souche n'a exprime le gène *qnrA*

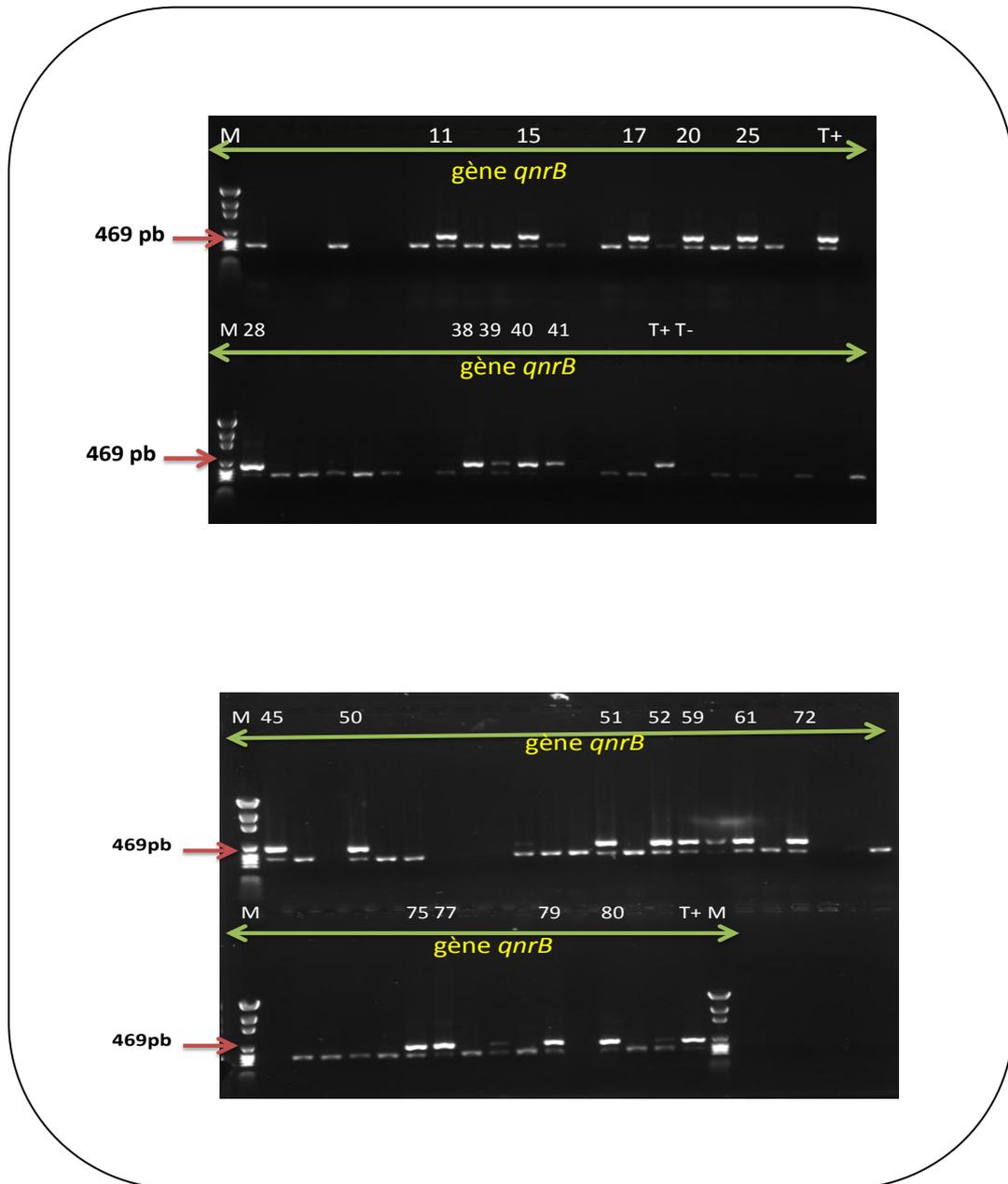


Figure 28: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *qnrB*.

Tableau 23: Profil moléculaire de la résistance associée des 80 souches KpBLSE aux aminosides et aux quinolones

N	Référence de la souche	16S méthylase	Enzymes modificateuses des aminosides		résistance aux quinolones
		armA	aadA	aac (6')-Ib	qnrB
1	Kp1	armA	aadA2	aac (6')-Ib-cr	-
2	Kp2	-	aadA2	aac (6')-Ib-cr	-
3	Kp3	-	-	aac(6')-Ib-cr	-
4	Kp4	-	aadA1	-	-
5	Kp5	armA	-	aac (6')-Ib-cr	-
6	Kp6	-	-	aac (6')-Ib-cr	-
7	Kp7	armA	aadA2	-	-
8	Kp8	-	aadA2	aac (6')-Ib-cr	-
9	Kp9	armA	aadA2	aac (6')-Ib-cr	-
10	Kp10	armA	aadA2	-	-
11	Kp11	-	aadA2	aac (6')-Ib-cr	qnrB-42
12	Kp12	armA	aadA2	-	-
13	Kp13	-	-	-	-
14	Kp14	armA	-	aac (6')-Ib-cr	-
15	Kp15	-	aadA2	aac (6')-Ib-cr	qnrB-42
16	Kp16	-	-	aac (6')-Ib-cr	-
17	Kp17	-	-	aac (6')-Ib-cr	qnrB-42
18	Kp18	armA	-	aac (6')-Ib-cr	-
19	Kp19	-	aadA2	aac (6')-Ib-cr	-
20	Kp20	-	aadA2	aac(6')-Ib-cr	qnrB-42
21	Kp21	-	-	aac (6')-Ib-cr	-
22	Kp22	-	-	aac (6')-Ib-cr	-
23	Kp23	-	-	-	-
24	Kp24	armA	aadA2	aac (6')-Ib-cr	-
25	Kp25	-	-	aac (6')-Ib-cr	qnrB-42
26	Kp26	-	aadD1	-	-
27	Kp27	-	-	aac (6')-Ib-cr	-
28	Kp29	armA	aadA2	aac (6')-Ib-cr	qnrB-42
29	Kp31	-	aadA1	-	-
30	Kp32	armA	aadA2	-	-
31	Kp33	-	aadA1	-	-
32	Kp34	-	-	-	-
33	Kp35	armA	aadA2	-	-
34	Kp37	-	-	-	-
35	Kp38	armA	aadA2	-	-
36	Kp40	armA	aadA2	-	-
37	Kp45	-	-	aac (6')-Ib-cr	-

38	Kp48	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
39	Kp50	-	aadA1	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
40	Kp52	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
41	Kp53	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
42	Kp55	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
43	Kp56	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
44	Kp57	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
45	Kp58	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
46	Kp59	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
47	Kp60	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
48	Kp61	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
49	Kp62	armA	-	-	-
50	Kp63	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
51	Kp64	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
52	Kp65	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
53	Kp66	armA	aadA2	-	-
54	Kp67	armA	aadA2	-	-
55	Kp68	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
56	Kp69	armA	aadA2	-	-
57	Kp70	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
58	Kp71	-	aadA1	-	-
59	Kp72	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
60	Kp75	armA	aadA2	-	-
61	Kp79	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
62	Kp81	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
63	Kp82	armA	aadA2	-	-
64	Kp83	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
65	Kp84	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
66	Kp85	-	-	-	-
67	Kp86	-	aadA2	-	-
68	Kp87	-	aadA2	-	-
69	Kp88	armA	aadA2	aac (6 ³)-Ib-cr	-
70	Kp89	-	-	-	-
71	Kp90	armA	-	-	qnrB-42
72	Kp91	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
73	Kp93	-	-	-	-
74	Kp94	armA	aadA2	-	-
75	Kp95	-	aadA2	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
76	Kp96	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	-
77	Kp97	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
78	Kp98	-	aadA2	-	-
79	Kp99	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42
80	Kp100	-	-	aac (6 ³)-Ib-cr	qnrB-42

9- Conjugaison bactérienne

Afin de tester la transférabilité du plasmide portant le gène *armA* et examiner une éventuelle association avec le gène CTX-M-15, des expériences de conjugaison ont été faites en utilisant la souche *E. coli* J53 résistante à l'azide de sodium comme souche réceptrice.

L'identification des transconjugants par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) a montré qu'il s'agit bien des souches d'*Escherichia coli* et avec de bons scores (Figure 29).

Les transconjugants avaient le même profil de sensibilité aux antibiotiques des souches donatrices, sauf qu'ils étaient sensibles à la rifampicine. Les CMI des cinq transconjugants ont montré des niveaux élevés de résistance à la gentamicine et l'amikacine (CMI > 256 µg/ml) et au céfotaxime (CMI > 256 µg/ml) (tableau 24, figure 30, figure 31).

Dans cette étude, après criblage des tranconjugants sur milieu sélectif, l'antibiogramme, les CMI, les réaction de PCR et le séquençage, nous avons constaté la présence simultanée du gène *armA* qui code pour la résistance élevée à tous les aminosides et le gène CTX-M-15 qui code pour une BLSE chez tout les transconjugants, ce qui suggère que les deux gènes soient portés par un même plasmide conjugatif et multirésistant qui peut alors disséminer entre les différentes espèces de bactéries causant ainsi des épidémies d'infections nosocomiales difficiles à traiter (figure 32).

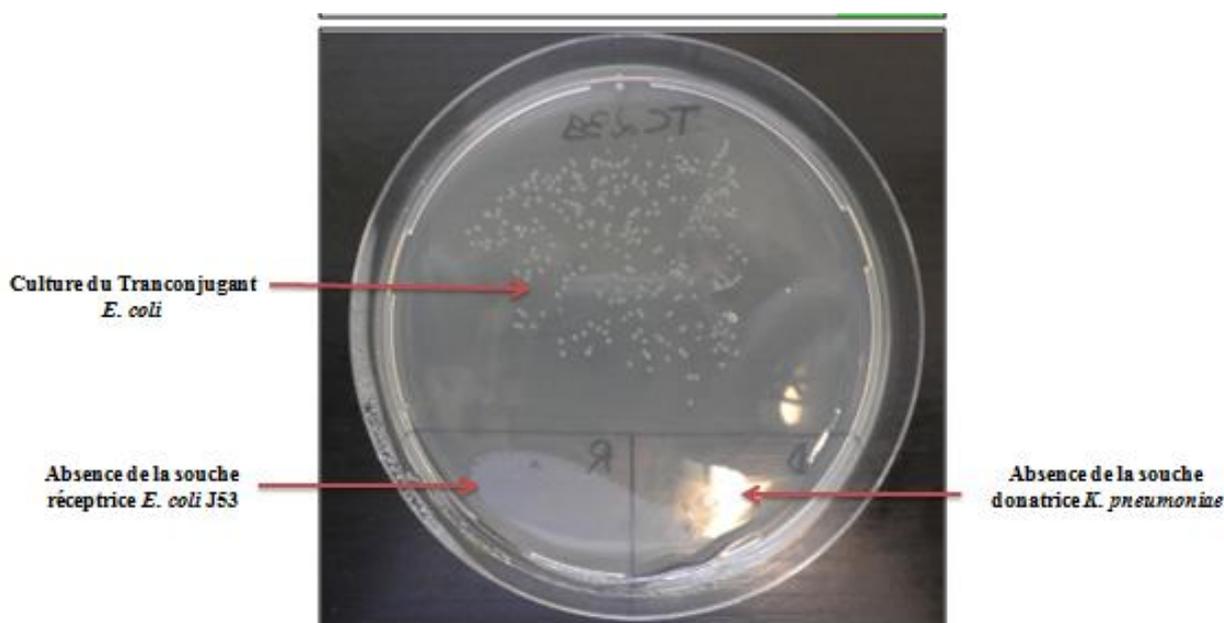
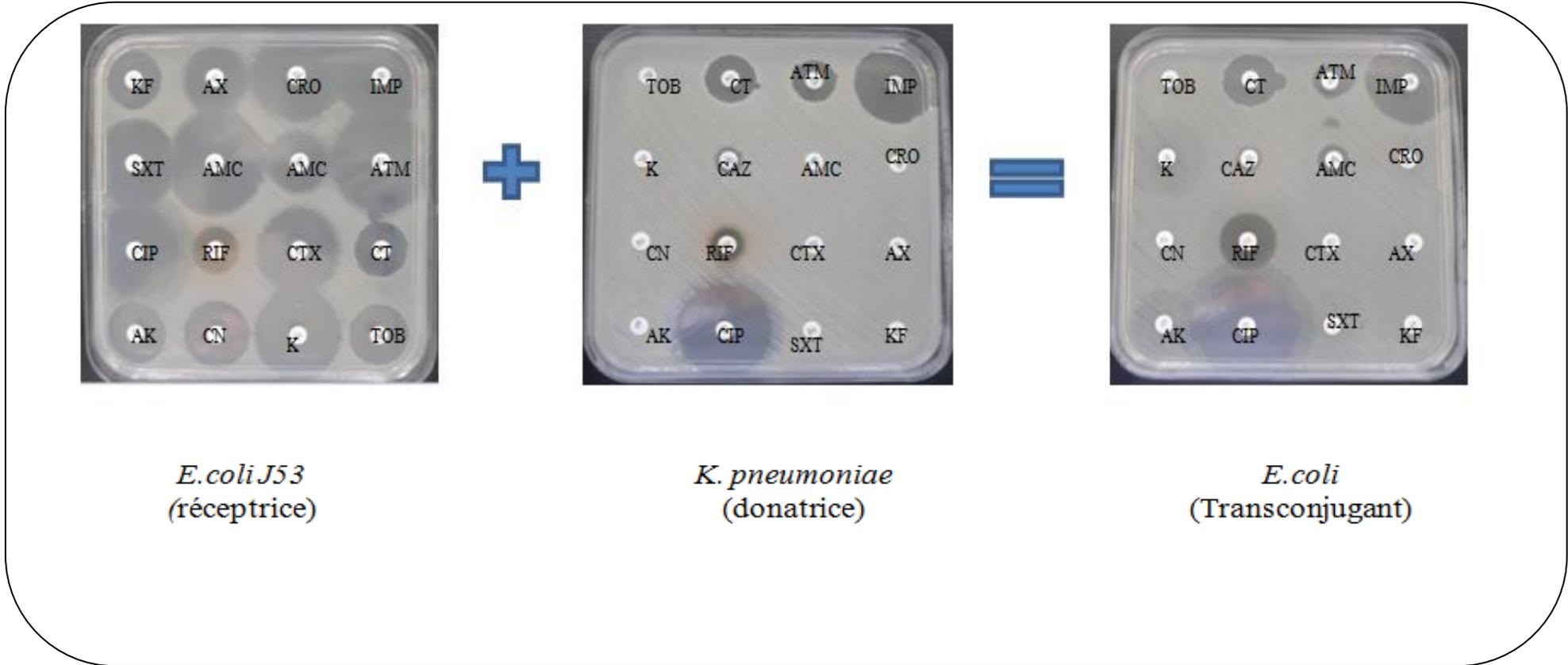


Figure 29 : Culture du transconjugant sur le milieu selectif de Lauria Bertani additionné de 100µg/ml Amikacine, 16µg/ml céfotaxime et 200 µg/ml azide

Tableau 24: Profil de résistance des 5 souches donatrices *K. pneumoniae* et les 5 souches d'*Eschericia coli* transconjugants

Antibiotiques	Souches										
	<i>E. coli J53</i>	Kp 7		Kp18		Kp35		Kp75		Kp94	
		D	TC								
Amoxicilline	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ax/ Clavulanic Acide	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefotaxime	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotine	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxone	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidime	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aztreonam	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Imépénème	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicine	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amikacine	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Kanamycine	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tobramicine	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicine	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Colistine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Trimethoprime-Sulfamathexazol	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R

D: Bactérie donatrice, TC: Transconjugant, Ax: Amoxicilline S: sensible, R: resistant



D: bactérie donatrice, TC: Transconjugant, Ax: Amoxicilline S: sensible, R: résistant, RIF : Rifampicine

Figure 30: Images des antibiogrammes des trois souches, montrant le transfert des déterminants de la résistance par un plasmide transconjugant.

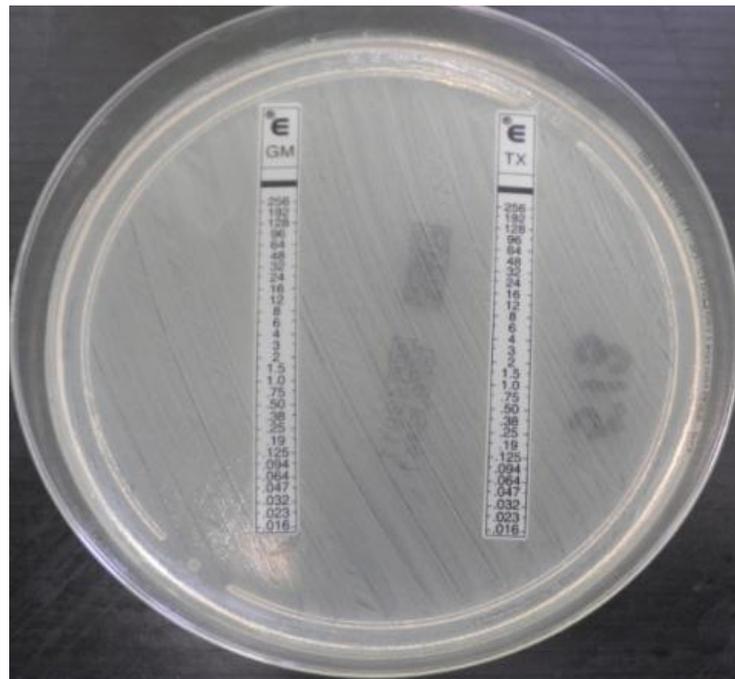


Figure 31: Image des CMI par E.Test de la céfotaxime et la gentamicine du transconjugant.

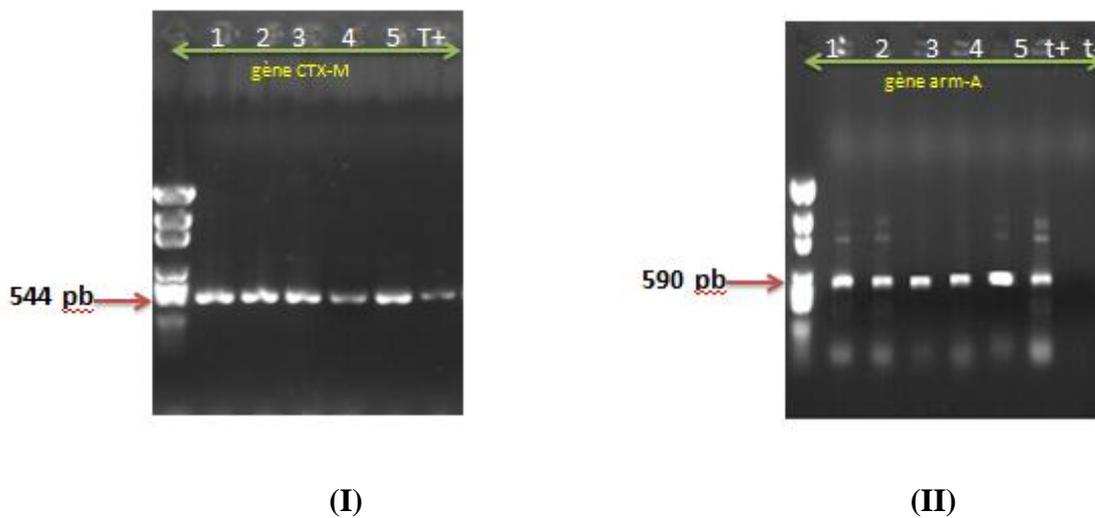


Figure 32: PCR des 5 souches d'*E. coli* transconjugants. (I) amplification du gène CTX-M par PCR standard, (II) amplification du gène armA par PCR standard.

10-Génotypage par *Multi-locus sequence typing* MLST

La recherche de la relation clonale entre les 23 souches KpBLSE qui possèdent le gène *armA* a été effectuée par l'amplification par PCR standard des 7 gènes de ménage de l'espèce *K. pneumoniae* (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, et *tonB*).

Après le séquençage des produits PCR des 7 gènes, les séquences obtenues ont été soumises à une base de données <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>, afin d'accorder pour chaque gène un profil allélique. La combinaison des 7 allèles obtenue à partir des 7 locus sélectionnés permet de définir une séquence type (ST) pour chaque souche. Les résultats sont montrés dans le tableau 25.

Le génotypage par MLST a révélé que les 23 souches appartiennent à 15 différents ST nouveaux en Algérie dont 4 ST (13, 39, 542 et 759) déjà rapportés dans le monde et 11 nouveaux ST qui n'ont jamais été décrits dans la littérature ; nous avons ensuite déposé les nouveaux profils à la base de donnée pour attribuer les nouveaux codes des 11 ST (1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396). Les informations des souches qui ont exprimé les 11 nouveaux ST sont enregistrées dans la base de données de l'institut Pasteur de Paris au nom du premier auteur de cette étude.

L'arbre phylogénétique est déduit à la succession des séquences des sept gènes de ménage. Les séquences obtenues ont été alignées par le logiciel ClustalW, ensuite analysées par le logiciel Mega 5, en utilisant la méthode « Neighbour-joining » (figure33).

A partir de l'analyse de l'arbre phylogénétique, nous avons pu identifier un cluster du clone ST39 qui comprend huit souches isolées au niveau du service de pédiatrie et des nouveaux -nés entre février et juin 2010, ce qui suggère qu'une épidémie due à la dissémination d'un clone de *K. pneumoniae* productrices de BLSE et d'*armA*, avait eu lieu au cours de cette période au sein du service de pédiatrie.

Tableau 25: Génotypage des 23 souches *K. pneumoniae* productrices du gène armA par MLST: Profil des allèles et leurs sequence type (ST).

Référence de la souche	Allèles							Sequence Type (ST)
	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	
Kp1	2	1	1	4	9	1	6	1386*
Kp5	2	3	1	1	10	1	19	13
Kp7	2	1	2	4	9	1	14	39
Kp9	2	1	2	4	9	1	14	39
Kp10	2	1	1	1	1	1	34	1387*
Kp12	2	1	2	4	1	1	34	1388*
Kp14	2	1	1	4	9	1	16	1386*
Kp18	2	1	2	4	9	1	14	39
Kp24	3	4	2	1	7	4	14	1389*
Kp29	2	1	2	1	7	1	19	1390*
Kp32	2	1	37	2	102	1	19	542
Kp35	2	6	1	26	10	1	14	1391*
Kp38	2	1	1	6	7	1	4	759
Kp40	4	1	1	1	10	16	86	1392*
Kp62	2	1	37	2	3	1	19	1393*
Kp66	2	1	2	4	1	1	14	1394*
Kp67	2	1	2	4	9	1	14	39
Kp69	2	1	2	4	9	1	14	39
Kp75	2	1	2	4	9	1	14	39
Kp82	2	1	2	4	9	1	14	39
Kp88	2	3	2	1	9	4	4	1395*
Kp90	2	1	1	1	10	1	86	1396*
Kp94	2	1	2	4	9	1	14	39

*Les nouveaux ST révélés dans cette étude.

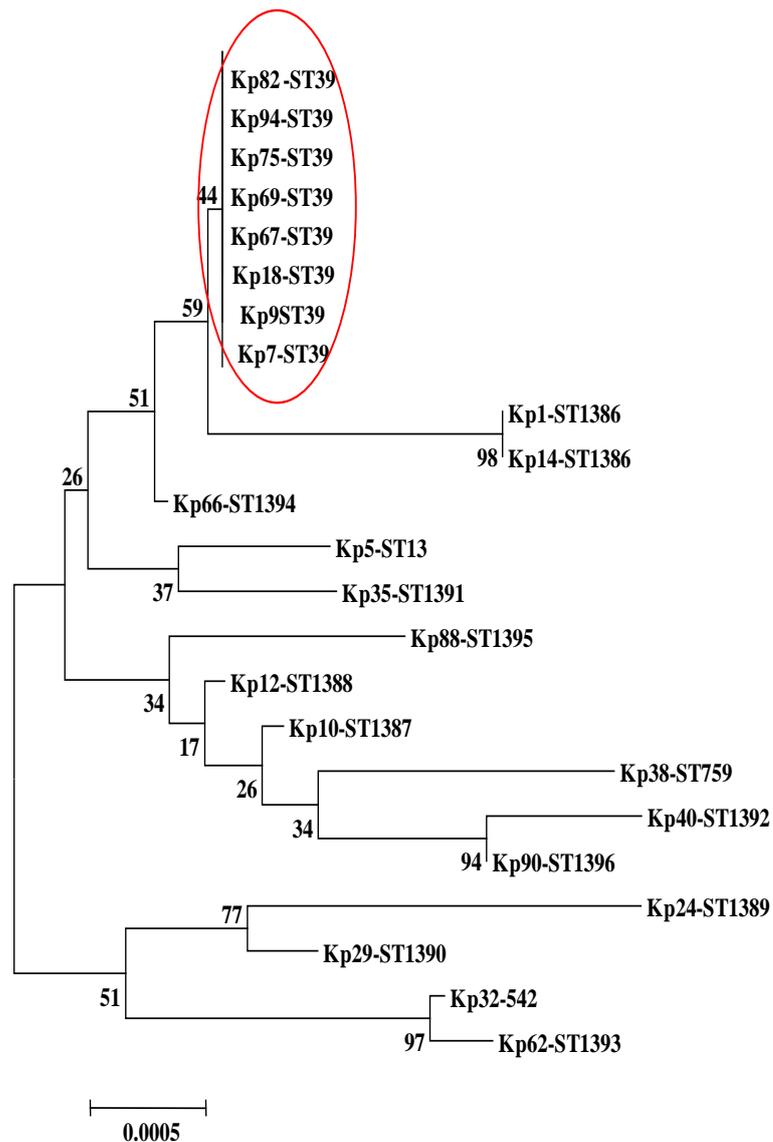


Figure 33: Arbre phylogénétique, des 23 souches de *K. pneumoniae* productrices du gène *armA*, déduit de l'analyse MLST et montrant le clone ST39.

Discussion

La fréquence des bactéries multirésistantes aux antibiotiques a atteint, partout dans le monde, des proportions inquiétantes et est devenue un problème majeur de santé publique.

Au cours des dernières décennies, une attention particulière dans le domaine des agents pathogènes multirésistants a été accordée aux staphylocoques dorés résistant à la méthicilline (SARM). Récemment, les bactéries à Gram négatif, notamment productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), ont gagné une importance croissante. Actuellement, le traitement des infections causées par ces organismes affiche un plus grand défi pour le clinicien par rapport aux infections à SARM (92),(59),(109).

Une méta-analyse a été réalisée par *Schwaber, et al* en 2007, portant sur l'impact de la production de BLSE sur la mortalité, comparé aux infections à des organismes non BLSE, a montré que les infections causées par des entérobactéries produisant des BLSE sont plus virulentes et associées à des résultats cliniques indésirables, y compris l'augmentation de la mortalité, des hospitalisations prolongées et des coûts économiques plus élevés (185).

Klebsiella pneumoniae a longtemps constitué l'espèce d'entérobactérie chez laquelle la production de BLSE était la plus fréquemment décrite (47)

K. pneumoniae se distingue comme un agent pathogène opportuniste important causant des infections nosocomiales surtout au sein des populations ayant un système immunitaire affaibli. Elle constitue une cause fréquente d'infections urinaires, de pneumonies et de bactériémies (63). De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment dans des unités de soins intensifs adulte ou pédiatrique (41).

Les objectifs de cette étude consistaient à évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* isolées au niveau des hôpitaux de la ville d'Annaba, de mettre en évidence la prévalence des souches productrices de BLSE, d'identifier le support génétique de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones, d'étudier la possibilité de transfert de cette résistance entre les bactéries et enfin le typage moléculaire des souches multirésistantes de *K. pneumoniae*.

Notre étude a porté sur 100 souches de *K. pneumoniae* collectées durant une période de deux ans (2010 et 2011), à partir de prélèvements bactériologiques à visée diagnostique reçus au laboratoire central de Microbiologie du CHU Dorban d'Annaba.

Durant les deux ans consacrés à notre l'étude, la fréquence d'isolement des souches de *K. pneumoniae* était de l'ordre de 8.2% par rapport au nombre total des bactéries isolées de patients hospitalisés dans le CHU d' Annaba. Cette fréquence est proche de celle trouvée aux Etats-Unis où *Klebsiella.spp* était responsable de 8% de l'ensemble des infections nosocomiales selon le NHSN (*National Healthcare Safety Network*) 2009-2010, classée ainsi au quatrième rang parmi les agents pathogènes associés à ces infections après *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus* à coagulase négatif (189).

Selon le rapport de l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) 2008, *Klebsiella spp* était responsable de 7% de l'ensemble des infections nosocomiales en Europe, classée ainsi au septième rang parmi les agents pathogènes associés à ces infections (77).

Au total, 100 patients infectés par *K. pneumoniae* sont concernés par cette étude, 54 femmes et 46 hommes le sexe ratio étant 0.85. Cette différence reste statistiquement non significative car ce critère physiologique ne semble pas influencer les infections nosocomiales (111). Par contre l'âge, qui est en rapport avec le statut immunitaire des patients, est en effet un des facteurs de risque pour l'infection par *K. pneumoniae* (217),(183),(46).

Dans notre étude, toutes les tranches d'âge sont touchées par les infections à *K. pneumoniae*, les extrémités d'âge variant entre 4 jours et 81 ans. La tranche d'âge prédominante (45%) représente la population néonatale et infantile. Dans ce contexte, il faut signaler que plusieurs publications ont évoqué le rôle de *K. pneumoniae* dans plusieurs infections nosocomiales touchant préférentiellement la population néonatale et pédiatrique (205),(217).

La plupart des souches de *K. pneumoniae* ont été isolées essentiellement chez les patients admis à l'hôpital pédiatrique Sainte Thérèse (48%) qui regroupe les services suivants : pédiatrie, réanimation pédiatrique et le service de néonatalogie. Ceci est peut être due à une épidémie et / ou une situation endémique dans l'unité, puisque la majorité des isolats provenaient de ces services dans une courte période. En outre, la catégorie de patients hospitalisés dans cette structure hospitalière est représentée par la population néonatale et pédiatrique.

En plus du bas âge et l'incompétence immunitaire de cette population, plusieurs facteurs de risque peuvent être responsables, notamment le cathétérisme des voies urinaires, les mauvaises conditions d'hygiène et la fréquence de la transmission manu portée par le personnel soignant.

En Tunisie, *K. pneumoniae* a été isolée des infections nosocomiales avec une fréquence de 25.8% en pédiatrie (120).

Au Nigeria, *K.pneumoniae* était responsable de 24.8% d'infections nosocomiales en service de pédiatrie (3).

En Europe *K.pneumoniae* était responsable de 22.7% d'infections nosocomiales en service de néonatalogie et de réanimation pédiatrique (176).

En Chine, *K.pneumoniae* était responsable de 19.6% d'infections nosocomiales chez l'enfant (130).

Le second service le plus touché par les infections à *K. pneumoniae* dans cette étude était le service d'endocrinologie qui regroupe généralement des sujets âgés diabétiques qui sont prédisposés à développer des infections des plaies et des blessures. Le facteur de risque principal dans ce service est le diabète avec une fréquence élevée de lésions de pied diabétique qui constitue une complication grave avec un risque d'amputation et de mortalité après amputation.

Une étude récente faite au niveau du CHU d'Annaba qui a porté sur la caractérisation moléculaires des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir des pieds diabétiques a montré que l'espèce *K. pneumoniae* occupe la deuxième place avec une fréquence de 83% dans les infections du pieds diabétique après *S. aureus* (85%) (69).

Dans notre étude, la fréquence de prélèvements urinaires par rapport aux autres produits pathologiques est dominante avec une fréquence de 39%. Ceci concorde avec d'autres rapports de la littérature.

Selon *Podschun et Ulman*, le système urinaire est le site le plus fréquent des infections nosocomiales à *K. pneumoniae* qui était responsable de 6 à 17% des infections urinaires nosocomiales, classée ainsi en cinquième position parmi tous les agents pathogènes incriminés (164).

Selon le NHSN, *K. pneumoniae* est responsable de 7.9 % de l'ensemble des infections urinaire aux Etats-unis, classée ainsi en cinquième position parmi tous les agents pathogènes incriminés (189). Cependant, en Tunisie, d'après le réseau de l'Antibio-Résistance en Tunisie (LART), *K pneumoniae* est essentiellement isolée d'infections urinaires en milieu hospitalier avec un taux de 60.4% (120).

Dans la région d'Annaba, peu de données actualisées permettent décrire l'évolution du niveau de résistance des *K. pneumoniae* aux antibiotiques au CHU d'Annaba afin d'actualiser les mesures prophylactiques et thérapeutiques.

K. pneumoniae résiste naturellement à l'ampicilline et aux carbénicillines par production de pénicillinases chromosomiques ; ce phénotype de résistance naturelle a été repéré dans 9% des cas. Elle résiste aux C3G surtout par production de bêtalactamase à spectre étendu dans 80% des cas et secondairement aux bêta-lactamines par production de pénicillinase de haut niveau avec une fréquence de 5%. La pénicillinase résistant aux inhibiteurs (PRI) a été produite par 2 % des souches de *K. pneumoniae*. Il est à noter que 4% des souches de *K. pneumoniae* étaient productrices de céphalosporinase plasmidiques. Par l'intermédiaire de toutes ces bêtalactamases, les souches de *K. pneumoniae* étudiées ont présenté des taux élevés de résistance vis-à-vis des molécules suivantes : la céfotaxime (C3G) 81% l'amoxicilline+acide clavulanique (AMC) 78% la cefalotine 91% alors qu'aucune souche n'a montré une résistance à l'imipènème.

Nous remarquons que nos taux de résistance sont généralement plus élevés que ceux rapportés par le réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (AARN). En effet, selon le dernier rapport d'évaluation correspondant à la période (Janvier 2011 à Décembre 2011), sur l'ensemble des souches testées 66.42%, et 62.8% étaient résistantes aux C3G et à l'AMC respectivement (177).

En Tunisie, selon le dernier rapport du réseau tunisien de surveillance, la fréquence de *K. pneumoniae* résistantes au C3G était de 51.5% en 2007 (120).

Le dernier rapport de l'*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-net) 2012 a montré une augmentation significative, relativement au rapport fait en 2009, du taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* aux C3G au niveau de tous les pays européens (France 22.6%, l'Italie 47.7%, l'Allemagne 13%, la Grèce 70.9%) (5).

Le dernier rapport de l' NHSN a aussi montré que 28.8% des souches de *K. pneumoniae* testées aux Etats-Unis étaient résistantes au C3G (189).

Le programme *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends* (SMART) 2009 qui a étudié l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans la région de l'Asie-Pacifique, a révélé que la résistance aux C3G des souches de *K. pneumoniae* isolées dans cette région était de l'ordre de 30% (43).

Nous croyons donc que le traitement des BGN incluant principalement les entérobactéries nécessite l'utilisation des aminosides le plus souvent en association avec les bêta-lactamines mais leur large utilisation a contribué à l'émergence de souches résistantes.

Dans la présente étude, la résistance aux aminosides était assez marquée pour la gentamicine avec un pourcentage de 56% suivi par 51% pour l'amikacine. Cependant, le dernier rapport de l'ARRN rapporte le taux de 60.13% et 21.7% de résistance de *K. pneumoniae* à la gentamicine et à l'amikacine respectivement (177).

En Tunisie, la résistance de *K. pneumoniae* à la gentamicine et à l'amikacine était dans 44.7% et 28.5% des cas respectivement (120).

Selon les données européennes de l'EARS-net 2012, ce taux de résistance trouvé à l'égard des aminosides se rapproche de celui trouvé en Grèce (62.9%), mais il reste supérieur à celui trouvé en France (23.6%), en Italie (42.2%) et en Espagne (14.1%) (5).

Concernant la résistance aux fluoroquinolones, un taux de résistance de 54% a été détecté chez nos souches. Ces résultats sont en accord avec le rapport de L'ARRN (47.01%) et LART (41.9%) (177),(5). Pareillement, selon le rapport de l'EARS-net, nos résultats avoisinent toujours le taux de l'Europe de l'Est la Grèce (69%) et l'Italie mais supérieur à celui de l'Europe de l'Ouest, la France (24.4%) et l'Espagne (16.5%) (5).

En ce qui concerne les autres molécules d'antibiotiques testées, des taux élevés de résistance ont été retrouvés dans notre collection, 84% de résistance a été révélée vis-à-vis des sulfamides et 64% à la fosfomycine. En revanche, la totalité de nos souches était sensible à la colistine. Compte tenu de l'émergence de souches pan résistantes (résistantes à tous les antibiotiques), les polymixines ont été réintroduites dans le protocole thérapeutique, notamment en service de réanimation, pouvant expliquer l'apparition de souches résistantes à cette molécule.

Chez les entérobactéries, la résistance à la colistine a été signalée surtout pour *K. pneumoniae* (200). Ces dernières années, plusieurs épidémies monoclonales ou multiclonaux ont été décrites dans les hôpitaux dans de nombreux pays, par exemple la Grèce, la Corée du Sud, les Etats-Unis et l'Italie. Le plus souvent, les épidémies sont dues à *K. pneumoniae* productrices de KPC et impliquent le clone ST258 (132).

La résistance acquise aux antibiotiques est un enjeu de santé publique majeur et plus que jamais d'actualité avec la diffusion massive des BLSE.

En Algérie, selon le rapport AARN publié en 2012, les souches productrices de BLSE représentent 30,28% des isolats d'entérobactéries en milieu hospitalier (N=4726), les données retenues étant celles de 12 laboratoires. L'espèce *K. pneumoniae* était en tête de liste avec une fréquence d'isolement à l'Hôpital de l'ordre de 57,66 % (177).

Dans cette étude, parmi les 100 de souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées nous rapportons un taux élevé (80%) de KpBLSE observées en 2010 et 2011 au CHU d'Annaba. Ce taux est proche de ce qui a été trouvé dans une étude publiée en 2011 qui a montré que le taux de BLSE en Algérie est de (88. 6 %) par rapport à celui de la France (26 . 8 %) (20). Par contre, ce taux est inférieur à ce qui a été trouvé à Tlemcen - Algérie (97,2 %) en 2010 (7) mais il reste supérieur à ce qui a été trouvé en 2009 (62,8 %) à Annaba (147) et bien supérieur à ce qui a été rapporté à Alger - Algérie (19,9%) en 2008 (139). Le taux de KpBLSE responsable d'infections urinaires au Maroc était de 34% en 2010 et de 20% en Tunisie en 2005 (56).

En comparant ces résultats avec ceux de l'étude mystique faite entre 1997et 2003 (208), et une autre étude de première instance de surveillance (2004-2009) (68), nous constatons une évolution dans le monde de gradient nord-sud du taux de production de BLSE chez des souches de *K. pneumoniae* avec 12.03 à 12.08 % en Amérique du Nord , 16,7% en Europe du Nord , 24,4% en Europe du Sud , 33,8 % au Moyen-Orient , de 28,2 à 35,6 % en Asie-Pacifique , de 45,5 à 51,9 % en Amérique du Sud et 54,9 % en Afrique .

Le dernier rapport d'EARS-net 2012 a révélé que 13 parmi les 20 pays européens montre un taux de production BLSE parmi les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux C3G compris entre 85% et 100 % (5).

La dernière étude SMART a révélé que les fréquence de production de BLSE par les souches de *K. pneumoniae* en Inde, la Thaïlande, les Philippines, la Malaisie, le Vietnam et la Chine étaient toutes supérieures à 30% (56,8%, 48%, 35,9%, 35,5%, 33,3%, et 31,9%, respectivement). En revanche, les pourcentages de production de BLSE ont été nettement inférieurs à 10% à Taiwan et à la Nouvelle-Zélande (43).

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette disparité : les facteurs épidémiologiques, socioéconomiques (pauvreté, hôpitaux surchargés, faible taux de ratio infirmière-patients, et l'hygiène hospitalière déficiente), ce qui entraîne des taux élevés de colonisation et d'infection. Ce dernier facteur est très important car les souches de *K. pneumoniae* présentent une aptitude particulière à acquérir des plasmides déterminants la production de BLSE. En plus des facteurs

suscités, l'utilisation massive des C3G expliquerait en partie le pourcentage élevé de production de BLSE en Algérie.

Il convient de signaler que parmi tous les services hospitaliers du CHU Annaba, la plus forte proportion des KpBLSE a été constatée en service de pédiatrie (57.5%).

Des études ont été menées sur les facteurs de risque de l'acquisition d'une KpBLSE dans le service de pédiatrie ont permis de démontrer que cela est associé de façon significative à l'âge de l'enfant à l'admission, son poids de naissance, l'administration d'une alimentation parentérale ou une antibiothérapie probabiliste initiale (90), (178), (24), (128), (109), (37), (50), (116), (26).

Selon le dernier rapport AARN la fréquence de production de BLSE par les souches de *K.pneumoniae* au service de pédiatrie était de 48.21% (177).

En Tunisie, la fréquence de production de BLSE par les souches de *K.pneumoniae* au service de pédiatrie était de 63.7% (120).

Une étude multicentrique européenne a montré une fréquence de 37.5% de KpBLSE impliquées dans les infections nosocomiales en service de pédiatrie (176).

Notre étude a révélé que la totalité (100%) des souches collectées à partir d'hémocultures était productrice de BLSE. De plus, elles ont été recueillies de patients hospitalisés dans le service de pédiatrie. Ce qui concorde avec les précédentes études qui ont montré que *K. pneumoniae* est l'agent bactérien le plus fréquent à l'origine de la septicémie néonatale (172). L'utilisation intensive de cathéters et de la nutrition parentérale prolongée chez les nourrissons malades sont parmi les raisons de ce taux élevé (131).

Selon le rapport de l'ECDC la fréquence de production de BLSE par les souches de *K.pneumoniae* isolées des hémocultures était de 24.8% en 2007 (201).

Selon le rapport du NHSN la fréquence de production de BLSE par les souches de *K.pneumoniae* isolées des hémocultures au niveau du service de pédiatrie était de 28.8% en 2010 (189).

En Chine, la fréquence de production de BLSE par les souches de *K.pneumoniae* isolées des hémocultures au niveau du service de pédiatrie était de 62% (118).

Dans notre étude, les souches KpBLSE ont montré une sensibilité diminuée vis-à-vis des aminosides, 69.23% des souches KpBLSE étaient co-résistantes à la gentamicine et 48.07% à l'amikacine. Ce taux de résistance est d'autant très inquiétant puisque l'amikacine est

considérée comme un aminoside de premier choix dans le traitement des infections nosocomiales à *K.pneumoniae* et surtout à KpBLSE (184). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par de nombreux auteurs qui indiquent que la résistance aux aminosides est souvent associée à la résistance aux β -lactamines : résistances médiées par le même plasmide (171).

En Espagne, 27.4% de souches d'entérobactéries productrices de BLSE étaient co-résistantes à la gentamicine (141).

Selon nos résultats, les fluoroquinolones conservent une bonne activité par rapport à d'autres études nationales, vis-à-vis des souches de KpBLSE. Le taux de résistance vis-à-vis de la ciprofloxacine des souches KpBLSE isolées était de 81.25%.

A Taiwan, selon le programme « TSAR » de la surveillance de la résistance aux antibiotiques 52.8% des souches de KpBLSE étaient résistantes à la ciprofloxacine (126)

En Espagne, 37.2 % de souches d'entérobactéries productrices de BLSE étaient co-résistantes à la ciprofloxacine (141).

Parmi nos souches de KpBLSE étudiées 87.5% étaient résistantes aux triméthopime sulfaméthoxazole.

Notre étude laisse apparaître un taux de 34% de souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées au CHU d'Annaba était non seulement productrices de BLSE mais aussi résistantes aux aminosides, aux quinolones et aux triméthopime-sulfaméthoxazole, ce qui constitue leur profil multirésistant « BMR ».

En Europe, selon le dernier rapport de l'EARS-net, le pourcentage des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes « BMR » est passé de 14.3% en 2009 à 18.5% en 2012 (5).

Alors qu'Etats-Unis, selon le rapport NHSN, le pourcentage des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes « BMR » était de 16% (146).

Les options thérapeutiques sont donc limitées dans ces infections impliquant de telles souches multirésistantes et font appel dans la majorité des cas aux carbapénèmes. En revanche, l'utilisation abusive de ces molécules n'était pas sans conséquences. Plusieurs études ont montré l'émergence de souches « pan résistantes » par l'association de multiples mécanismes de résistance. Par exemple en Europe, et selon le dernier rapport de l'EARS-net, le pourcentage des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes résistantes au carbapénèmes était de 6.2% (5). Alors

qu'au Etats-Unis, selon le rapport NHSN, le pourcentage des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes est passé de 3.2% en 2009 à 6.2% en 2012 (146).

Le support génétique des enzymes BLSE produits par les 80 souches de *K. pneumoniae* isolées dans notre étude était varié. Le type CTX-M a été détecté chez 76 (95%) des isolats, le type SHV chez 73 (91,25%) des isolats et 74 (92,5%) des isolats hébergeaient le gène TEM. Chaque souche (80) produisait plus d'une BLSE.

Cette étude souligne, d'une part l'augmentation de la fréquence de la production de BLSE par les souches de *K. pneumoniae* isolées en Algérie, et d'autre part confirme la propagation mondiale du gène CTX-M-15(41).

Dans la présente étude, la diversité génétique des gènes BLSE peut être attribuée à des gènes déjà détectés (TEM-1, SHV-1, SHV-11, SHV-28, SHV-33, SHV-12) (7,139,147,174,206), et l'émergence de nouveaux clusters dans notre zone géographique (SHV-133, SHV-1a, SHV-2a, SHV-26, et SHV-32).

Le gène SHV-1a a été déjà rapporté à Taiwan en 2006 chez une souche de *K. pneumoniae* (127), le gène SHV-2a a été déjà isolé dans différents continents en provenance de différentes espèces bactériennes mais récemment en 2013 en Egypte chez une souche de *K. pneumoniae* (148). Par ailleurs, les gènes SHV-26 et SHV-32 ont été révélés durant la même année (2013) au Maroc chez des souches de *K. pneumoniae* communautaires (12). Il faut souligner que le gène SHV-133 n'a jamais été rapporté à l'exception de la présente étude.

Notre étude a révélé également la première détection d'un nouveau gène le CTX-M-38 (un membre du groupe CTX-M 9) en Algérie et en Afrique. Ce gène a été rapporté seulement en Asie lors de deux recherches faites en Chine chez des souches d'*Escherichia coli* (101,218).

La recherche moléculaire du support génétique de la résistance associée aux β -lactamines a permis de trouver une diversité des gènes de résistance. Parmi notre collection, nous avons détecté la présence du gène qnrB chez 22 souches Kp-BLSE. Ce gène qui confère la résistance aux fluoroquinolones a été déjà détecté en Algérie mais avec une faible fréquence par rapport à la nôtre (103),(103,103,138).

Notre étude a révélé la première détection du gène qnrB-42 en Algérie. Ce dernier a été également détecté en France en 2012 (89). Le gène qnrB a toujours été associé au gène aac(6)-Ib-cr mais ce dernier était plus fréquent et a été détecté chez 50 KpBLSE isolées. Cette variante est une acétyltransférase qui fait partie des enzymes modificateuses des aminosides (AMEs). Elle

confère une résistance simultanée à la ciprofloxacine et aux aminosides (27). Elle a été rapportée en Algérie dans des études antérieures (7,138).

Parmi les autres AMEs, nous avons noté que 35 souches KpBLSE hébergent le gène *aadA* dont 35 *aadA2* et 4 *aadA1*, ce dernier a été récemment détecté chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à Tlemcen (187).

Nous avons révélé la première détection au niveau des hôpitaux algériens de 23 souches KpBLSE exprimant le gène *armA* : une méthyltransférase du 16S ARNr qui code pour la résistance à tous les aminosides cliniquement pertinents. Toutes les souches possédant le gène *armA* ont exprimé de hauts niveaux de résistance à l'amikacine et à la gentamicine avec une CMI supérieure à 256µg/ml.

Cependant, ce gène a été trouvé chez des souches de *K. pneumoniae* isolées chez quatre patients d'origine Algérienne. Ce qui a été rapporté par une enquête sur les hôpitaux Belges entre 2000 et 2005 (23).

En Algérie, Le gène *armA* a également été trouvé chez *Salmonella enterica* productrice de BLSE à Constantine (144) et *Salmonella non-typhi* productrice de BLSE de type CTX-M-15 à Annaba en 2009 (28). Récemment, le gène *armA* a été identifié en combinaison avec le gène NDM-1 chez *K. pneumoniae* souches à Nepal (202).

Notre taux d'isolement du gène *armA* est plus élevé que celui constaté chez les entérobactéries productrices de BLSE en Grèce (0,2%) en 2012 (84) et en France (1,3%) en 2007 (19). Par ailleurs, la prévalence du gène *ArmA* reste inférieure à celle trouvée chez les souches de *K. pneumoniae* « BMR » en Chine (54,5%) en 2009 (215). La méthylase ARNr 16S semble donc être plus répandue en Asie qu'en Europe et en Amérique (84).

La résistance transférable aux C3G et aux aminosides par production de BLSE et le 16s ARNr méthyltransphérase entraîne l'émergence de bactéries multi-résistantes BMR, limitant ainsi les possibilités thérapeutiques.

La dissémination de ces BMR peut impliquer l'association de plusieurs mécanismes : propagation de souches épidémiques ou gènes de résistance. Les investigations concernant cette dissémination nécessitent une compréhension des mécanismes et les risques potentiels qui s'y rapportent.

Notre attention s'est surtout portée, dans la suite de cette étude, sur les 23 souches KpBLSE qui portant le gène *armA* qui sont donc les souches résistantes aux C3G et aux aminosides simultanément. Nous avons donc sélectionné cinq souches comme donneur putatif afin de tester la transférabilité de ces deux gènes par des expériences de conjugaison bactérienne *in vitro*.

Les résultats issus de cette expérience ont montré que tous les transconjugants ont exprimé le même niveau de résistance aux antibiotiques communément utilisés. Le gène CTX-M-15 a été co-transféré avec le gène *armA*, ce qui suggère que les souches hébergent un plasmide conjugatif. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes qui ont démontré que les gènes de BLSE et le gène *armA* sont souvent localisés sur un plasmide conjugatif responsable de nombreuses épidémies (143).

Nous pouvons déduire de ces observations que ces bactéries multirésistantes constituent dans notre établissement un risque infectieux croissant. En effet, les gènes codant pour les ARNr 16S méthylase et CTXM-15 sont portés par des plasmides dont le caractère transférable peut être responsable d'une diffusion clonale au sein de l'espèce ainsi qu'entre différentes espèces.

Le développement de la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques peut sérieusement compromettre l'utilisation clinique des aminosides ou les quinolones combinés avec les β -lactamines pour traiter les infections dues aux bactéries à Gram négatif (99).

Ainsi, un traitement efficace doit être sélectionné en fonction de l'antibiogramme afin de limiter l'utilisation des carbapénèmes lorsque cela est possible. En effet, la classe des carbapénèmes comme l'imipénème est le traitement de premier choix pour traiter les bactéries productrices des enzymes BLSE parce que ces enzymes ne l'hydrolysent pas (152).

Actuellement, les carbapénèmes sont de plus en plus utilisés dans le monde entier car c'est souvent le médicament de dernier recours pour traiter les infections graves causées par les entérobactéries productrices de BLSE (153). Néanmoins, Il a été démontré que, lors de ce traitement, une fréquence élevée de la résistance à l'imipénème peut être sélectionnée (152,166) ; ainsi, le taux élevé de KpBLSE présente un risque d'émergence de la résistance à la classe des carbapénèmes (153).

Contrairement à l'Algérie, l'émergence de carbapénémases parmi les souches de *K.pneumoniae* a été largement décrite dans de nombreuses parties du monde, y compris l'Afrique du Nord qui est pourtant considérée comme une zone endémique du gène OXA-48 (170).

En Tunisie, la dissémination des souches de *K. pneumoniae* productrices du gène OXA-48 a été découverte en 2010 (117) alors que le premier signalement d'une souche clinique de *K. pneumoniae* qui exprime une co-production de NDM-1 et OXA-48 a été publié en 2013 (16).

Au Maroc, l'émergence de souches cliniques de *K.pneumoniae* productrices de la nouvelle carbapénèmase NDM-1 a été révélée en 2011 (166). Puis, des souches cliniques de *K. pneumoniae* ont été révélées productrices de carbapénèmase de OXA-48 en 2012 (96). Ensuite, la première souche clinique de *K.pneumoniae* qui a exprimé la coproduction de trois gènes qui codent pour des carbapénèmases : NDM-1, VIM-1 et OXA-48 a été signalée en 2013 (11) .

L'étude de la relation clonale entre les 23 souches KpBLSE qui possèdent le gène *armA* a été réalisée en utilisant la technique génotypique : *multi-locus sequence type* (MLST). Ce dernier a révélé que ces souches appartenaient à 15 différents clones ou séquences types (ST) dont 4 ST déjà connus (ST13, ST39, ST542 et ST759) et 11 nouvelles ST révélées pour la première fois dans cette étude (1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396).

Suite à cette découverte, nous avons soumis les profils alléliques à la base de données de l'Institut Pasteur de Paris pour nous accorder les nouveaux codes des séquences types. Les informations concernant des souches qui ont exprimé les 11 nouveaux ST sont enregistrées dans la base de données de l'Institut Pasteur de Paris au nom du premier auteur de cette étude.

A partir de l'analyse de l'arbre phylogénétique, nous avons pu identifier un cluster (grappe) du clone ST39 qui comprend huit souches isolées au niveau du service de pédiatrie et des nouveaux nés entre février et juin 2010, ce qui suggère qu'une épidémie due à la dissémination d'un clone de *K. pneumoniae* qui héberge à la fois les gènes BLSE et *armA* avait eu lieu au cours de cette période en pédiatrie.

En 2013, Ce clone épidémique, ST39, était lié à une épidémie causée par une souche de *K.pneumoniae* productrice de carbapénèmase OXA-48 dans une unité néonatale en Israël (1) . La même année, le ST39, lié à une épidémie nosocomiale causée par une souche de *K.pneumoniae* productrice de carbapénèmase VIM a également été déclaré en Espagne ; cependant, ce clone ST39 n'a jamais été associé à des épidémies à *K. pneumoniae* productrices du gène *armA*.

L'épidémie a duré cinq mois de février 2010 à Juin 2010 avec le même clone de ST39, ce qui suggère une source commune d'infection et de transmission. Dans les études cas-témoins et plus

de la moitié des enquêtes précédentes pour la source de tels épisodes prolongés sont restés non identifiées (131).

Cette difficulté peut être liée à la capacité de *K. pneumoniae* de survivre dans l'environnement et être une source de contamination. De plus, les mains des travailleurs de santé servent de réservoirs pour la transmission de l'organisme et sont responsables de plusieurs épidémies hospitalières. En outre, les nouveau-nés sont particulièrement des hôtes sensibles en raison de leur système immunitaire immature et leurs faible poids à la naissance, en particulier lorsque les dispositifs invasifs (une source de contamination) sont utilisés (17). Toutefois, en raison de la rareté des données cliniques disponibles concernant les souches isolées à partir de cette unité, aucune source d'infection n'a été trouvée.

En Somme, l'émergence d'un tel clone de bactéries multirésistantes qui sont probablement responsables d'épidémies nosocomiales est inquiétante, car il a déjà limité les options thérapeutiques des infections causées par ces bactéries.

Partie 4 : Conclusion et perspectives

Conclusion

Les résultats de cette étude permettent de fournir des données épidémiologiques sur les souches de *K.pneumoniae* au niveau du CHU d'Annaba ainsi qu'une évaluation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques des trois principales familles. Ce type d'étude d'incidence représente un des éléments épidémiologiques qui peut être intégré dans un programme plus global de lutte contre la dissémination des bactéries multi-résistantes.

Différentes études de surveillance mondiales ont confirmé l'ampleur de la production des BLSE chez *K. pneumoniae*. Celle-ci restreint considérablement le choix thérapeutique disponible dans le traitement de ces infections sévères d'autant plus que des gènes de résistance à d'autres antibiotiques leurs sont souvent associés (aminosides, fluoroquinolones).

Notre étude a révélé un taux élevé de fréquence des (80%) KpBLSE qui a exprimé également des résistances notamment aux aminosides et aux fluoroquinolones. La recherche moléculaire du support génétique de ces résistances a révélé une diversité génétique des gènes qui codent pour les BLSE avec l'émergence de nouveaux gènes dans notre zone géographique. De plus, cette étude confirme la propagation internationale du gène CTX-M-15 qui était hébergé par 95% des KpBLSE. Quant à la résistance aux aminosides, nous avons détecté pour la première fois l'émergence de souches de *K. pneumoniae* productrices du gène *armA* qui confère la résistance à tous les aminosides cliniquement pertinents au niveau des CHU d'Annaba, rendant ainsi les options du traitement des infections causées par ces micro-organismes plus restreintes. De plus, la présence de ces déterminants de résistance sur un plasmide conjugatif favorise leur mobilité et leur dissémination. En outre en utilisant la technique du MLST afin de rechercher la relation clonale entre les souches KpBLSE qui portent le gène *armA*, nous avons pu identifier un clone ST39 composé de plusieurs souches isolées chez les nouveaux nés au niveau du service de pédiatrie. Ce dernier représente le service qui a hébergé la majorité des souches de *K. pneumoniae* isolées dans cette étude

En définitive, nos résultats ayant révélé un taux élevé de *K. pneumoniae* BMR qui ne peut être qu'un facteur favorisant les antibiothérapies qui comportent des carbapénèmes, ce qui induirait par la suite la sélection des souches résistantes aux carbapénèmes.

Finally, this study draws attention to the risk of emergence and dissemination of carbapenemase which represents a worldwide worrying problem and highlights the need for adequate surveillance of BMR strains in Algerian hospitals in particular in intensive care and pediatric units which are most often associated with a high mortality rate.

Perspectives

Ce travail a souligné le risque de l'émergence de la résistance aux carbapénèmes au niveau de nos hôpitaux. Le contrôle du réservoir de cette résistance est désormais un objectif majeur de santé publique, en particulier la mise au point des tests rapides permettant la détection des souches productrices de carbapénémases contribuerait à éviter leur dissémination nosocomiale.

Compte tenu de l'absence de développement de nouvelles molécules actives contre les bactéries à Gram négatif dans les prochaines années, une bonne gestion du contrôle des infections pour prolonger la vie des antibiotiques existant devient impérative. Aussi, L'amélioration de la Microbiologie du laboratoire et de son interaction avec le management du patient sont également essentiels.

Actuellement, il faut un intervalle d'au moins 48 heures pour découvrir les résultats du laboratoire du diagnostic clinique de l'infection du patient indiquant la sensibilité aux antibiotiques de l'isolat. Durant cet intervalle, le patient est traité de façon empirique en fonction des agents pathogènes probables et les taux locaux de résistance. On commence généralement par des antibiotiques empiriques les plus puissants, généralement un carbapénème combiné avec un agent anti-SARM, et à «désamorcer» une fois les résultats de laboratoire de Microbiologie disponibles. Bien que cette stratégie améliore la couverture initiale, dont peut en bénéficier le patient, cela va potentiellement conduire à une utilisation prolongée inutile des antibiotiques à large spectre ainsi l'augmentation de la sélection des bactéries résistantes.

La situation serait améliorée si la Microbiologie pouvait être accélérée, l'identification des agents pathogènes et leur résistance aux antibiotiques en heures plutôt qu'en jours et sans la nécessité de la culture.

Des Méthodes potentielles existent, y compris la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et des techniques de Biologie moléculaire telle que l'amplification par PCR des amorces à ADN pour rechercher des espèces et des gènes de résistance spécifiques. Néanmoins, de grands défis restent à relever, en particulier le coût élevé de ces appareils.

Un tel développement permettrait de réduire les coûts des longs séjours d'hospitalisation et d'antibiothérapie et de limiter la sélection et la diffusion de bactéries hautement résistantes.

Par ailleurs, une surveillance régulière de l'épidémiologie des souches résistantes, une bonne pratique d'hygiène et l'isolement des patients porteurs de souches multi-résistantes pourraient arrêter les épidémies d'infections nosocomiales causées par ces bactéries dans nos hôpitaux.

Références bibliographiques

1. **Adler, A., E. Solter, S. Masarwa, T. Miller-Roll, B. Abu-Libdeh, H. Khammash, K. Najem, S. Dekadek, C. Stein-Zamir, N. Nubani, A. Kunbar, M. V. Assous, Y. Carmeli, and M. J. Schwaber.** 2013. Epidemiological and Microbiological Characteristics of an Outbreak Caused by OXA-48-Producing *Enterobacteriaceae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Jerusalem, Israel. *J.Clin.Microbiol.* **51**:2926-2930.
2. **Amako, K., Y. Meno, and A. Takade.** 1988. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J.Bacteriol.* **170**:4960-4962.
3. **Ambe, J. P., I. S. Gasi, and Y. Mava.** 2007. Review of neonatal infections in University of Maiduguri Teaching Hospital: common bacterial pathogens seen. *Niger.J.Clin.Pract.* **10**:290-293.
4. **Ambler, R. P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **289**:321-331.
5. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe.** 2012. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf> .
6. **Api 20E Identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods.** 2002. <http://site.iugaza.edu.ps/mlaqqan/files/2012/04/Api20E1.pdf>.
7. **Baba Ahmed-Kazi, T. Z., D. Decre, N. Genel, Z. Boucherit-Otmani, G. Arlet, and M. Drissi.** 2013. Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb.Drug Resist.*
8. **BAER, H. and L. EHRENWORTH.** 1956. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* for mice: the relationship to the quantity and rate of production of type-specific capsular polysaccharide. *J.Bacteriol.* **72**:713-717.
9. **Bagley, S. T.** 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect.Control* **6**:52-58.
10. **Bagley, S. T., R. J. Seidler, H. W. Talbot, Jr., and J. E. Morrow.** 1978. Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Appl.Environ.Microbiol.* **36**:178-185.
11. **Barguigua, A., O. F. El, Y. F. Lakbakbi El, M. Talmi, K. Zerouali, and M. Timinouni.** 2013. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *APMIS* **121**:675-677.
12. **Barguigua, A., O. F. El, M. Talmi, F. Bourjilat, F. Haouzane, K. Zerouali, and M. Timinouni.** 2011. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. *J.Med.Microbiol.* **60**:1344-1352.
13. **Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, S. Ernst, and J. M. Casellas.** 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and

- relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:509-513.
14. **Beauclerk, A. A. and E. Cundliffe.** 1987. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J.Mol.Biol.* **193**:661-671.
 15. **Belbel, Z., H. Chettibi, M. Dekhil, A. Ladjama, S. Nedjai, and J. M. Rolain.** 2014. Outbreak of an armA Methyltransferase-Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital. *Microb.Drug Resist.*
 16. **Ben, N. A., B. Bercot, L. Poirel, P. Nordmann, D. Decre, F. Compain, N. Genel, F. Barguellil, and G. Arlet.** 2013. Emergence of NDM-1 in Association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **57**:4089-4090.
 17. **Bennet, R., M. Eriksson, B. Melen, and R. Zetterstrom.** 1985. Changes in the incidence and spectrum of neonatal septicemia during a fifteen-year period. *Acta Paediatr.Scand.* **74**:687-690.
 18. **Benouda, A., O. Touzani, M. T. Khairallah, G. F. Araj, and G. M. Matar.** 2010. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* **104**:327-330.
 19. **Bercot, B., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2008. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:4526-4527.
 20. **Berrazeg, M., S. M. Diene, M. Drissi, M. Kempf, H. Richet, L. Landraud, and J. M. Rolain.** 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS.One.* **8**:e61428.
 21. **Bertrand, X., D. Hocquet, K. Boisson, E. Siebor, P. Plesiat, and D. Talon.** 2003. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase in a French university-affiliated hospital. *Int.J.Antimicrob.Agents* **22**:128-133.
 22. **Birkett, C. I., H. A. Ludlam, N. Woodford, D. F. Brown, N. M. Brown, M. T. Roberts, N. Milner, and M. D. Curran.** 2007. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J.Med.Microbiol.* **56**:52-55.
 23. **Bogaerts, P., M. Galimand, C. Bauraing, A. Deplano, R. Vanhoof, M. R. De, H. Rodriguez-Villalobos, M. Struelens, and Y. Glupczynski.** 2007. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J.Antimicrob.Chemother.* **59**:459-464.
 24. **Bolat, F., S. Uslu, G. Bolat, S. Comert, E. Can, A. Bulbul, and A. Nuhoglu.** 2012. Healthcare-associated infections in a Neonatal Intensive Care Unit in Turkey. *Indian Pediatr.* **49**:951-957.
 25. **Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1-14.

26. **Boo, N. Y., S. F. Ng, and V. K. Lim.** 2005. A case-control study of risk factors associated with rectal colonization of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella sp.* in newborn infants. *J.Hosp.Infect.* **61**:68-74.
27. **Bouchakour, M., K. Zerouali, J. D. Gros Claude, H. Amarouch, M. N. El, P. Courvalin, and M. Timinouni.** 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Morocco. *J.Infect.Dev.Ctries.* **4**:779-803.
28. **Bouzidi, N., L. Aoun, M. Dekhil, S. A. Granier, L. Poirel, A. Brisabois, P. Nordmann, and Y. Millemann.** 2011. Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene armA in *non-Typhi Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J.Antimicrob.Chemother.* **66**:2180-2181.
29. **Bradford, P. A.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin.Microbiol.Rev.* **14**:933-951.
30. **Brenner, D. J. and S. J. T. G. Krieg N R.** 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Seconde Edition.
31. **Brisse, S. and E. Duijkeren.** 2005. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet.Microbiol.* **105**:307-312.
32. **Brisse, S., C. Fevre, V. Passet, S. Issenhuth-Jeanjean, R. Tournebize, L. Diancourt, and P. Grimont.** 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS.One.* **4**:e4982.
33. **Brisse, S., S. Issenhuth-Jeanjean, and P. A. Grimont.** 2004. Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *J.Clin.Microbiol.* **42**:3388-3398.
34. **Brown, C. and R. J. Seidler.** 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl.Microbiol.* **25**:900-904.
35. **Bryskier, A.** 1984. [Classification of beta-lactams]. *Pathol.Biol.(Paris)* **32**:658-667.
36. **Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:1211-1233.
37. **Cantey, J. B., P. Sreeramoju, M. Jaleel, S. Trevino, R. Gander, L. S. Hynan, J. Hill, C. Brown, W. Chung, J. D. Siegel, and P. J. Sanchez.** 2013. Prompt control of an outbreak caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J.Pediatr.* **163**:672-679.
38. **Canton, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**:144-153.
39. **Carniel, E.** 1999. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int.Microbiol.* **2**:161-167.

40. **Carpenter, J. L.** 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev.Infect.Dis.* **12**:672-682.
41. **Carrer, A. and P. Nordmann.** 2011. [CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: a change in the epidemiology of ESBL]. *Pathol.Biol.(Paris)* **59**:e133-e135.
42. **Carrer, A., L. Poirel, H. Eraksoy, A. A. Cagatay, S. Badur, and P. Nordmann.** 2008. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:2950-2954.
43. **Chen, Y. H., P. R. Hsueh, R. E. Badal, S. P. Hawser, D. J. Hoban, S. K. Bouchillon, Y. Ni, and D. L. Paterson.** 2011. Antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region according to currently established susceptibility interpretive criteria. *J.Infect.* **62**:280-291.
44. **Cheng, D. L., Y. C. Liu, M. Y. Yen, C. Y. Liu, and R. S. Wang.** 1991. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Arch.Intern.Med.* **151**:1557-1559.
45. **Christensen, S. C. and B. Korner.** 1972. An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in a urological unit. *Scand.J.Urol.Nephrol.* **6**:232-238.
46. **Colodner, R., R. Raz, B. Chazan, and W. Sakran.** 2004. Susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria isolated from inpatients to five antimicrobial drugs in a community hospital in Northern Israel. *Int.J.Antimicrob.Agents* **24**:409-410.
47. **Colodner, R., W. Rock, B. Chazan, N. Keller, N. Guy, W. Sakran, and R. Raz.** 2004. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **23**:163-167.
48. **Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie.** 1997. <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/remic/24-Antib.pdf>.
49. **Courvalin, P., R. Leclercq, and E. Bingen.** 2006. *Antibiogramme*.**2**:142-162, 227-246, 263-277.
50. **Crivaro, V., M. Bagattini, M. F. Salza, F. Raimondi, F. Rossano, M. Triassi, and R. Zarrilli.** 2007. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. *J.Hosp.Infect.* **67**:135-141.
51. **Cryz, S. J., Jr., F. Furer, and R. Germanier.** 1984. Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infect.Immun.* **43**:440-441.
52. **Cundliffe, E.** 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu.Rev.Microbiol.* **43**:207-233.
53. **Cuzon, G., T. Naas, A. Lesenne, M. Benhamou, and P. Nordmann.** 2010. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int.J.Antimicrob.Agents* **36**:91-93.

54. **Cuzon, G., J. Ouanich, R. Gondret, T. Naas, and P. Nordmann.** 2011. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob.Agents Chemother.* **55**:2420-2423.
55. **Dabernat, H., O. Petitjean, and S. J. P. W. P. Schlemmer.** 1997. *Infectiologie de A à Z.* 354-355.
56. **Dahmen, S., D. Bettaieb, W. Mansour, N. Boujaafar, O. Bouallegue, and G. Arlet.** 2010. Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a Tunisian University Hospital. *Microb.Drug Resist.* **16**:163-170.
57. **Davis, B. D.** 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol.Rev.* **51**:341-350.
58. **Davison, J.** 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**:73-91. doi:10.1006/plas.1999.1421
59. **de Kraker, M. E., P. G. Davey, and H. Grundmann.** 2011. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS.Med.* **8**:e1001104.
60. **de la Cruz, F. and J. Davies.** 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* **8**:128-133.
61. **de Oliveira, G. D., Y. Doi, D. Szabo, J. M. Adams-Haduch, T. M. Vaz, D. Leite, M. C. Padoveze, M. P. Freire, F. P. Silveira, and D. L. Paterson.** 2008. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:1790-1793.
62. **Decre, D., B. Gachot, J. C. Lucet, G. Arlet, E. Bergogne-Berezin, and B. Regnier.** 1998. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin.Infect.Dis.* **27**:834-844.
63. **Decre, D., C. Verdet, A. Emirian, G. T. Le, J. C. Petit, G. Offenstadt, E. Maury, S. Brisse, and G. Arlet.** 2011. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J.Clin.Microbiol.* **49**:3012-3014.
64. **Deng, Y. T., Z. L. Zeng, W. Tian, T. Yang, and J. H. Liu.** 2013. Prevalence and characteristics of rmtB and qepA in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Front Microbiol.* **4**:198.
65. **Détermination in Vitro de la CMI (E-test).** 2014. http://microcsb.net/IMG/pdf/cmi_e_test.pdf.
66. **Diancourt, L., V. Passet, J. Verhoef, P. A. Grimont, and S. Brisse.** 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J.Clin.Microbiol.* **43**:4178-4182.

67. **Diene, S. M., N. Bruder, D. Raoult, and J. M. Rolain.** 2011. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int.J.Antimicrob.Agents* **37**:544-546.
68. **Diene, S. M., V. Merhej, M. Henry, F. A. El, V. Roux, C. Robert, S. Azza, F. Gavory, V. Barbe, S. B. La, D. Raoult, and J. M. Rolain.** 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.
69. **Djahmi, N., N. Messad, S. Nedjai, A. Moussaoui, D. Mazouz, J. L. Richard, A. Sotto, and J. P. Lavigne.** 2013. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin.Microbiol.Infect.* **19**:E398-E404.
70. **Domenico, P., W. G. Johanson, Jr., and D. C. Straus.** 1982. Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.* **37**:327-335.
71. **Drancourt, M., C. Bollet, A. Carta, and P. Rousselier.** 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**:925-932.
72. **Drieux, L., F. Brossier, W. Sougakoff, and V. Jarlier.** 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**:90-103.
73. **Drlica, K., H. Hiasa, R. Kerns, M. Malik, A. Mustaev, and X. Zhao.** 2009. Quinolones: action and resistance updated. *Curr.Top.Med.Chem.* **9**:981-998.
74. **Du, X. D., D. X. Li, G. Z. Hu, Y. Wang, Y. H. Shang, C. M. Wu, H. B. Liu, and X. S. Li.** 2012. Tn1548-associated armA is co-located with qnrB2, aac(6')-Ib-cr and blaCTX-M-3 on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. *J.Antimicrob.Chemother.* **67**:246-248.
75. **Edmondson, A. S., E. M. Cooke, A. P. Wilcock, and R. Shinebaum.** 1980. A comparison of the properties of *Klebsiella* strains isolated from different sources. *J.Med.Microbiol.* **13**:541-550.
76. **Essack, S. Y., L. M. Hall, D. G. Pillay, M. L. McFadyen, and D. M. Livermore.** 2001. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:88-95.
77. **European Centre for Disease Prevention and Control.** 2008. Annual Epidemiological Report On Communicable Diseases In Europe 2008 http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/0812sur_annual_epidemiological_report_2008.pdf.
78. **Fang, C. T., Y. P. Chuang, C. T. Shun, S. C. Chang, and J. T. Wang.** 2004. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J.Exp.Med.* **199**:697-705.

79. **Frazer, B. W., S. Hansen, and L. Lambert.** 2009. Invasive infection with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: multiple cases presenting to a single emergency department in the United States. *Ann. Emerg. Med.* **53**:639-642.
80. **Freney J, Renaud F, R. Leclercq, and Riegel P.** 2007. Précis de Bactériologie Clinique. 1001-1014. 649-665.
81. **Freney J, R. F., Hansen W, and Bollet TC.** 2000. Précis de bactériologie clinique.
82. **Freney, J., J. Fleurette, L. D. Gruer, M. Desmonceaux, F. Gavini, and H. Leclerc.** 1984. *Klebsiella trevisanii* colonisation and septicaemia. *Lancet* **1**:909.
83. **Fritsche, T. R., M. Castanheira, G. H. Miller, R. N. Jones, and E. S. Armstrong.** 2008. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1843-1845.
84. **Galani, I., M. Souli, T. Panagea, G. Poulakou, K. Kanellakopoulou, and H. Giamarellou.** 2012. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Enterobacteriaceae* isolates from a Greek university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**:E52-E54.
85. **Galimand, M., P. Courvalin, and T. Lambert.** 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2565-2571.
86. **Garcia, d. I. T., J. Romero-Vivas, J. Martinez-Beltran, A. Guerrero, M. Meseguer, and E. Bouza.** 1985. *Klebsiella* bacteremia: an analysis of 100 episodes. *Rev. Infect. Dis.* **7**:143-150.
87. **Giakkoupi, P., L. S. Tzouveleki, A. Tsakris, V. Loukova, D. Sofianou, and E. Tzelepi.** 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2247-2253.
88. **Gniadkowski, M.** 2008. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** Suppl 1:11-32.
89. **Guillard, T., C. C. De, H. Moret, X. Bertrand, J. M. Schefftel, and E. Cambau.** 2012. High-resolution melting analysis for rapid characterization of qnr alleles in clinical isolates and detection of two novel alleles, qnrB25 and qnrB42. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:2635-2639.
90. **Gupta, A., K. Ampofo, D. Rubenstein, and L. Saiman.** 2003. Extended spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *J. Perinatol.* **23**:439-443.
91. **Hacker, J. and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641-679.
92. **Hagel, S., A. Stallmach, P. Keller, and M. Pletz.** 2013. [Multiresistant Organisms.]. *Zentralbl. Chir.*

93. **Hancock, R. E., S. W. Farmer, Z. S. Li, and K. Poole.** 1991. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:1309-1314.
94. **Haverkorn, M. L. and M. F. Michel.** 1979. Nosocomial *Klebsiellas*. I. Colonization of hospitalized patients. *J.Hyg.(Lond)* **82**:177-193.
95. **Hawkey, P. M. and A. M. Jones.** 2009. The changing epidemiology of resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* **64 Suppl 1**:i3-10.
96. **Hays, C., A. Benouda, L. Poirel, M. Elouennass, and P. Nordmann.** 2012. Nosocomial occurrence of OXA-48-producing enterobacterial isolates in a Moroccan hospital. *Int.J.Antimicrob.Agents* **39**:545-547.
97. **Heritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin.Microbiol.Infect.* **12**:123-130.
98. **Hibbert-Rogers, L. C., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, P. M. Hawkey, N. Todd, I. J. Lewis, and C. Bailey.** 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *J.Antimicrob.Chemother.* **36**:65-82.
99. **Hidalgo, L., K. L. Hopkins, B. Gutierrez, C. M. Ovejero, S. Shukla, S. Douthwaite, K. N. Prasad, N. Woodford, and B. Gonzalez-Zorn.** 2013. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J.Antimicrob.Chemother.*
100. **Highsmith, A. K. and W. R. Jarvis.** 1985. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect.Control* **6**:75-77.
101. **Ho, P. L., R. C. Wong, K. H. Chow, K. Yip, S. S. Wong, and T. L. Que.** 2008. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J.Microbiol.Immunol.Infect.* **41**:428-432.
102. **Iabadene, H., C. Dallenne, Y. Messai, D. Geneste, R. Bakour, and G. Arlet.** 2009. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:4043-4044.
103. **Iabadene, H., Y. Messai, H. Ammari, N. Ramdani-Bouguessa, S. Lounes, R. Bakour, and G. Arlet.** 2008. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J.Antimicrob.Chemother.* **62**:133-136.
104. **Jacoby, G. A., N. Chow, and K. B. Waites.** 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:559-562.
105. **Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper.** 2006. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:1178-1182.
106. **Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore, and J. A. Lake.** 2002. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor.Popul.Biol.* **61**:489-495.

107. **Jarlier, V., M. H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon.** 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev.Infect.Dis.* **10**:867-878.
108. **Jehl F, Chomar M, Weber M, Gerard A.** 2003. De l'antibiogramme à la prescription. Ed, Biomérieux. 31-64.
109. **Kamath, S., S. Mallaya, and S. Shenoy.** 2010. Nosocomial infections in neonatal intensive care units: profile, risk factor assessment and antibiogram. *Indian J.Pediatr.* **77**:37-39.
110. **Kang, H. Y., K. Y. Kim, J. Kim, J. C. Lee, Y. C. Lee, D. T. Cho, and S. Y. Seol.** 2008. Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. *J.Clin.Microbiol.* **46**:700-706.
111. **Kariuki, S., G. Revathi, J. Corkill, J. Kiiru, J. Mwituria, N. Mirza, and C. A. Hart.** 2007. *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. *J.Infect.Dev.Ctries.* **1**:257-262.
112. **Kassis-Chikhani, N., D. Decre, V. Gautier, B. Burghoffer, F. Saliba, D. Mathieu, D. Samuel, D. Castaing, J. C. Petit, E. Dussaix, and G. Arlet.** 2006. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. *J.Antimicrob.Chemother.* **57**:142-145.
113. **Kim, J. Y., Y. J. Park, H. J. Kwon, K. Han, M. W. Kang, and G. J. Woo.** 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J.Antimicrob.Chemother.* **62**:479-483.
114. **Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and S. Mitsuhashi.** 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**:315-317.
115. **Kocsis, E., C. Savio, M. Piccoli, G. Cornaglia, and A. Mazzariol.** 2013. *Klebsiella pneumoniae* harbouring OXA-48 carbapenemase in a Libyan refugee in Italy. *Clin.Microbiol.Infect.* **19**:E409-E411.
116. **Kristof, K., D. Szabo, J. W. Marsh, V. Cser, L. Janik, F. Rozgonyi, A. Nobilis, K. Nagy, and D. L. Paterson.** 2007. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella spp.* in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **26**:563-570.
117. **Ktari, S., B. Mnif, F. Louati, S. Rekik, S. Mezghani, F. Mahjoubi, and A. Hammami.** 2011. Spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *J.Antimicrob.Chemother.* **66**:1644-1646.
118. **Kuang, L. H., Y. M. Jiang, Z. Q. Hu, L. Y. Mu, M. Su, and W. Zhou.** 2013. [Species and drug resistance of pathogens in blood cultures from the pediatric hematology ward]. *Zhongguo Dang.Dai Er.Ke.Za Zhi.* **15**:259-263.

119. **Kumar, A., S. Chakraborti, P. Joshi, P. Chakrabarti, and R. Chakraborty.** 2011. A multiple antibiotic and serum resistant oligotrophic strain, *Klebsiella pneumoniae* MB45 having novel dfrA30, is sensitive to ZnO QDs. *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.* **10**:19.
120. **L'Antibio-Résistance en Tunisie.** 2007.
<http://www.infectiologie.org.tn/pdf/lart/LART.pdf>.
121. **Le Minor L and Véron M.** 1989. Bactériologie médicale, 2ème édition , Flammarion Médecine-Sciences, Paris.**2**:428-432.
122. **Les milieux de culture chromogènes and Biomérieux.** 2014.
<http://www.biomerieux.com/fr/milieux-de-culture-chromogenes-chromid-resultats-rapides-fiabiles-facilement-interpretables>.
123. **LESHER, G. Y., E. J. FROELICH, M. D. GRUETT, J. H. BAILEY, and R. P. BRUNDAGE.** 1962. 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *J.Med.Pharm.Chem.* **91**:1063-1065.
124. **Lewin, C. S., B. M. Howard, and J. T. Smith.** 1991. Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J.Med.Microbiol.* **34**:19-22.
125. **Lewis, J. F. and J. J. Alexander.** 1979. Meningitis and septicemia due to *Klebsiella ozaenae*. *Am.J.Clin.Pathol.* **72**:1033-1034.
126. **Lin, C. J., L. K. Siu, L. Ma, Y. T. Chang, and P. L. Lu.** 2012. Molecular epidemiology of ciprofloxacin-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Microb.Drug Resist.* **18**:52-58.
127. **Lin, T. L., S. I. Tang, C. T. Fang, P. R. Hsueh, S. C. Chang, and J. T. Wang.** 2006. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Klebsiella pneumoniae* strains in Taiwan: recharacterization of shv-27, shv-41, and tem-116. *Microb.Drug Resist.* **12**:12-15.
128. **Lohr, I. H., S. Rettedal, O. B. Natas, U. Naseer, K. Oymar, and A. Sundsfjord.** 2013. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J.Antimicrob.Chemother.* **68**:1043-1048..
129. **Magnet, S. and J. S. Blanchard.** 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem.Rev.* **105**:477-498.
130. **Mai, J. Y., L. Dong, Z. L. Lin, and S. Q. Chen.** 2011. [Investigation and analysis of nosocomial infection in neonates]. *Zhonghua Er.Ke.Za Zhi.* **49**:915-920.
131. **Maltezou, H. C., E. Papacharalambous, K. Tryfinopoulou, L. Ftika, A. Maragos, G. Kyriakeli, P. Katerelos, C. Trakateli, M. Polemis, E. Roilides, A. Vatopoulos, and N. Nikolaidis.** 2013. Outbreak of pan-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Scand.J.Infect.Dis.* **45**:872-877.
132. **Mammìna, C., C. Bonura, B. F. Di, A. Aleo, T. Fasciana, C. Sodano, M. A. Saporito, M. S. Verde, R. Tetamo, and D. M. Palma.** 2012. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro.Surveill* **17**.

133. **Matsen, J. M., J. A. Spindler, and R. O. Blosser.** 1974. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl.Microbiol.* **28**:672-678.
134. **Matsumoto, Y. and M. Inoue.** 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:307-313.
135. **McCarthy, V. P. and V. S. Hubbard.** 1984. *Klebsiella ozaenae* in a patient with cystic fibrosis. *Arch.Intern.Med.* **144**:408-409.
136. **Melano, R., A. Corso, A. Petroni, D. Centron, B. Orman, A. Pereyra, N. Moreno, and M. Galas.** 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:36-42.
137. **Menard, R., C. Molinas, M. Arthur, J. Duval, P. Courvalin, and R. Leclercq.** 1993. Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:78-83.
138. **Meradi, L., A. Djahoudi, A. Abdi, M. Bouchakour, J. D. Perrier Gros Claude, and M. Timinouni.** 2011. [Qnr and aac (6')-Ib-cr types quinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolated in Annaba, Algeria]. *Pathol.Biol.(Paris)* **59**:e73-e78.
139. **Messai, Y., H. Iabadene, T. Benhassine, S. Alouache, M. Tazir, V. Gautier, G. Arlet, and R. Bakour.** 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol.Biol.(Paris)* **56**:319-325.
140. **Mizuta, K., M. Ohta, M. Mori, T. Hasegawa, I. Nakashima, and N. Kato.** 1983. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect.Immun.* **40**:56-61.
141. **Morosini, M. I., M. Garcia-Castillo, T. M. Coque, A. Valverde, A. Novais, E. Loza, F. Baquero, and R. Canton.** 2006. Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:2695-2699.
142. **Munoz-Price, L. S., L. Poirel, R. A. Bonomo, M. J. Schwaber, G. L. Daikos, M. Cormican, G. Cornaglia, J. Garau, M. Gniadkowski, M. K. Hayden, K. Kumarasamy, D. M. Livermore, J. J. Maya, P. Nordmann, J. B. Patel, D. L. Paterson, J. Pitout, M. V. Villegas, H. Wang, N. Woodford, and J. P. Quinn.** 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect.Dis.* **13**:785-796.
143. **Naas, T., C. Bentchouala, G. Cuzon, S. Yaou, A. Lezzar, F. Smati, and P. Nordmann.** 2011. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int.J.Antimicrob.Agents* **38**:135-139.
144. **Naas, T., C. Bentchouala, S. Lima, A. Lezzar, F. Smati, J. M. Scheftel, and P. Nordmann.** 2009. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-

- beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* Senftenberg isolates from Algeria. *J.Antimicrob.Chemother.* **64**:866-868.
145. **Naas, T., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**:42-52.
 146. **National Healthcare Safety Network (NHSN).** 2014. <http://www.cdc.gov/nhsn/dataStat.html>.
 147. **Nedjai, S., A. Barguigua, N. Djahmi, L. Jamali, K. Zerouali, M. Dekhil, and M. Timinouni.** 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med.Mal Infect.* **42**:20-29.
 148. **Newire, E. A., S. F. Ahmed, B. House, E. Valiente, and G. Pimentel.** 2013. Detection of new SHV-12, SHV-5 and SHV-2a variants of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.* **12**:16.
 149. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
 150. **Nikaido, H.** 2000. Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clin.Microbiol.Infect.* **6 Suppl 3**:22-26.
 151. **Noppe-Leclercq, I., F. Wallet, S. Haentjens, R. Courcol, and M. Simonet.** 1999. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res.Microbiol.* **150**:317-322.
 152. **Nordmann, P. and A. Carrer.** 2010. [Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*]. *Arch.Pediatr.* **17 Suppl 4**:S154-S162.
 153. **Nordmann, P., G. Cuzon, and T. Naas.** 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect.Dis.* **9**:228-236.
 154. **Nordmann, P., L. Poirel, T. R. Walsh, and D. M. Livermore.** 2011. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* **19**:588-595.
 155. **Paradis, S., M. Boissinot, N. Paquette, S. D. Belanger, E. A. Martel, D. K. Boudreau, F. J. Picard, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron.** 2005. Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**:2013-2025.
 156. **Park, S., K. M. Lee, Y. S. Yoo, J. S. Yoo, J. I. Yoo, H. S. Kim, Y. S. Lee, and G. T. Chung.** 2011. Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Osong.Public Health Res.Perspect.* **2**:164-170.
 157. **Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol.Rev.* **33**:757-784.
 158. **Paterson, D. L. and R. A. Bonomo.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin.Microbiol.Rev.* **18**:657-686.

159. **Peng, H. L., P. Y. Wang, J. L. Wu, C. T. Chiu, and H. Y. Chang.** 1991. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. *Zhonghua Min Guo. Wei Sheng Wu Ji. Mian. Yi. Xue. Za Zhi.* **24**:264-271.
160. **Pitart, C., M. Sole, I. Roca, A. Fabrega, J. Vila, and F. Marco.** 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:4398-4401.
161. **Podschun, R.** 1990. Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **189**:527-535.
162. **Podschun, R., I. Penner, and U. Ullmann.** 1992. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb. Pathog.* **13**:371-379.
163. **Podschun, R. and U. Ullmann.** 1992. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J. Med. Microbiol.* **36**:250-254.
164. **Podschun, R. and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:589-603.
165. **Poirel, L., M. O. Abdelaziz, S. Bernabeu, and P. Nordmann.** 2013. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41**:90-91.
166. **Poirel, L., A. Benouda, C. Hays, and P. Nordmann.** 2011. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:2781-2783.
167. **Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, and P. Nordmann.** 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:15-22.
168. **Porto, R., O. Hevia, G. T. Hensley, and P. R. Meyer.** 1989. Disseminated *Klebsiella rhinoscleromatis* infection. *Arch. Pathol. Lab Med.* **113**:1381-1383.
169. **Potron, A., P. Nordmann, E. Lafeuille, M. Z. Al, R. F. Al, and L. Poirel.** 2011. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:4896-4899.
170. **Potron, A., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2014. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:467-471.
171. **Quentin, C., C. Arpin, V. Dubois, C. Andre, I. Lagrange, I. Fischer, J. P. Brochet, F. Grobost, J. Jullin, B. Dutilh, G. Larribet, and P. Noury.** 2004. Antibiotic resistance rates and phenotypes among isolates of *Enterobacteriaceae* in French extra-hospital practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:185-193.
172. **Quinet, B., D. Mitanchez, B. Salauze, A. Carbonne, E. Bingen, S. Fournier, D. Moissenet, and H. Vu-Thien.** 2010. [Description and investigation of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* strain in a neonatal unit]. *Arch. Pediatr.* **17** Suppl 4:S145-S149.

173. **Quinteros, M., M. Radice, N. Gardella, M. M. Rodriguez, N. Costa, D. Korbenfeld, E. Couto, and G. Gutkind.** 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:2864-2867.
174. **Ramdani-Bouguessa, N., V. Manageiro, D. Jones-Dias, E. Ferreira, M. Tazir, and M. Canica.** 2011. Role of SHV beta-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to beta-lactams in an Algerian hospital. *J.Med.Microbiol.* **60**:983-987.
175. **Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky.** 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist.Updat.* **13**:151-171.
176. **Raymond, J. and Y. Aujard.** 2000. Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **21**:260-263.
177. **Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques.** 2012. Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 13ème Rapport d'évaluation (Janvier Décembre 2011) <http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf>.
178. **Rettedal, S., L. Hoyland, I. O. Natas, A. Sundsfjord, and K. Oymar.** 2013. Risk factors for acquisition of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during an outbreak in a neonatal intensive care unit in Norway. *Scand.J.Infect.Dis.* **45**:54-58.
179. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat.Med.* **12**:83-88.
180. **Robin, F., N. Aggoune-Khinache, J. Delmas, M. Naim, and R. Bonnet.** 2010. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **54**:466-470.
181. **Rosenblueth, M., L. Martinez, J. Silva, and E. Martinez-Romero.** 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst.Appl.Microbiol.* **27**:27-35.
182. **Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea, and C. Mugnaioli.** 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Infect.* **14** Suppl 1:33-41.
183. **Samanta, S., K. Farrer, A. Breathnach, and P. T. Heath.** 2011. Risk factors for late onset gram-negative infections: a case-control study. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* **96**:F15-F18.
184. **Schelenz, S., K. Bramham, and D. Goldsmith.** 2007. Septic arthritis due to extended spectrum beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Joint Bone Spine* **74**:275-278.
185. **Schwaber, M. J. and Y. Carmeli.** 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J.Antimicrob.Chemother.* **60**:913-920.

186. **Sebghati, T. A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, and S. Clegg.** 1998. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect.Immun.* **66**:2887-2894.
187. **Sefraoui, I., M. Berrazeg, M. Drissi, and J. M. Rolain.** 2013. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated from Western Algeria Between 2009 and 2012. *Microb.Drug Resist.*
188. **Seng, P., J. M. Rolain, P. E. Fournier, S. B. La, M. Drancourt, and D. Raoult.** 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future.Microbiol.* **5**:1733-1754
189. **Sievert, D. M., P. Ricks, J. R. Edwards, A. Schneider, J. Patel, A. Srinivasan, A. Kallen, B. Limbago, and S. Fridkin.** 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **34**:1-14.
190. **Silva, J., C. Aguilar, G. Ayala, M. A. Estrada, U. Garza-Ramos, R. Lara-Lemus, and L. Ledezma.** 2000. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:997-1003.
191. **Simoons-Smit, A. M., A. M. Verweij-van Vught, I. Y. Kanis, and D. M. MacLaren.** 1985. Chemiluminescence of human leukocytes stimulated by clinical isolates of *Klebsiella*. *J.Med.Microbiol.* **19**:333-338.
192. **Simoons-Smit, A. M., A. M. Verweij-van Vught, and D. M. MacLaren.** 1986. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J.Med.Microbiol.* **21**:133-137.
193. **Simoons-Smit, A. M., A. M. Verwey-van Vught, I. Y. Kanis, and D. M. MacLaren.** 1984. Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. *J.Med.Microbiol.* **17**:67-77.
194. **Singleton P, W. J.** 2005. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.
195. **Sirot, D.** 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J.Antimicrob.Chemother.* **36** Suppl A:19-34.
196. **Soussy, C. J.** 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/sfm/2010_antibiotiques_casfm.pdf.
197. **Spratt, B. G.** 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**:2999-3003.
198. **Strampfer, M. J., P. E. Schoch, and B. A. Cunha.** 1987. Cerebral abscess caused by *Klebsiella ozaenae*. *J.Clin.Microbiol.* **25**:1553-1554.
199. **Struve, C., M. Bojer, and K. A. Kroghelt.** 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect.Immun.* **76**:4055-4065.
200. **Suh, J. Y., J. S. Son, D. R. Chung, K. R. Peck, K. S. Ko, and J. H. Song.** 2010. Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob.Agents Chemother.* **54**:560-562.

201. **Surveillance of healthcare-associated infections in Europe 2007.** 2007. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/120215_sur_hai_2007.pdf.
202. **Tada, T., T. Miyoshi-Akiyama, R. K. Dahal, S. K. Mishra, H. Ohara, K. Shimada, T. Kirikae, and B. M. Pokhrel.** 2013. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int.J.Antimicrob.Agents* **42**:372-374.
203. **Tang, L. M. and S. T. Chen.** 1994. *Klebsiella pneumoniae* meningitis: prognostic factors. *Scand.J.Infect.Dis.* **26**:95-102.
204. **Tolmasky, M. E. and J. H. Crosa.** 1987. Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **31**:1955-1960.
205. **Tosson, A. M. and C. P. Speer.** 2011. Microbial pathogens causative of neonatal sepsis in Arabic countries. *J.Matern.Fetal Neonatal Med.* **24**:990-994.
206. **Touati, A., S. Benallaoua, D. Forte, J. Madoux, L. Brasme, and C. C. De.** 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int.J.Antimicrob.Agents* **27**:397-402.
207. **Touati, A., L. Brasme, S. Benallaoua, A. Gharout, J. Madoux, and C. C. De.** 2008. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **60**:287-290.
208. **Turner, P. J.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases. *Clin.Infect.Dis.* **41** Suppl 4:S273-S275.
209. **Turton, J. F., H. Englender, S. N. Gabriel, S. E. Turton, M. E. Kaufmann, and T. L. Pitt.** 2007. Genetically similar isolates of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing liver abscesses in three continents. *J.Med.Microbiol.* **56**:593-597.
210. **Wachino, J. and Y. Arakawa.** 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist.Updat.* **15**:133-148.
211. **Weldhagen, G. F., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:2385-2392.
212. **Williams, P., P. A. Lambert, M. R. Brown, and R. J. Jones.** 1983. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J.Gen.Microbiol.* **129**:2181-2191.
213. **Woodford, N., P. M. Tierno, Jr., K. Young, L. Tysall, M. F. Palepou, E. Ward, R. E. Painter, D. F. Suber, D. Shungu, L. L. Silver, K. Inglima, J. Kornblum, and D. M. Livermore.** 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:4793-4799.

214. **Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa.** 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol.Lett.* **184**:53-56.
215. **Yang, J., L. Ye, W. Wang, Y. Luo, Y. Zhang, and L. Han.** 2011. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int.J.Antimicrob.Agents* **38**:348-351.
216. **Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh.** 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.
217. **Zaidi, A. K., D. Thaver, S. A. Ali, and T. A. Khan.** 2009. Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developing countries. *Pediatr.Infect.Dis.J.* **28**:S10-S18.
218. **Zhang, Z., X. Guo, and Q. Zhang.** 2009. Prevalence characterization of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in Zhengzhou. *J.Clin.Lab Anal.* **23**:404-407.

Résumé

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères. L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, notamment chez *K. pneumoniae*, représente un problème majeur de santé publique. Cette étude a pour objectifs d'évaluer et de caractériser le support génétique de la résistance aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* isolées dans les différents services hospitaliers du CHU de la ville d'Annaba en 2010 et 2011.

D'abord, l'identification de 100 souches de *K. pneumoniae* a été effectuée par Api 20E et confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS). Ensuite, les tests de sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion de disques sur gélose et CMI par E. Test) ont été réalisés selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie. Une recherche phénotypique de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) a été également effectuée. Par ailleurs, les gènes de résistance aux antibiotiques ont été caractérisés par les techniques de Biologie Moléculaire (PCR et séquençage). En outre, la transférabilité des déterminants de résistance a été testée par des expériences de conjugaison en utilisant l'*E.coli* J53 comme souche réceptrice. Enfin, l'étude de la relation clonale entre les souches multi-résistantes a été déterminée par la technique *Multi-locus Sequence Typing* (MLST).

Les résultats issus de cette étude ont montré une résistance élevée des souches cliniques de *K.pneumoniae* à la majorité des antibiotiques cliniquement utilisés particulièrement aux β -lactamines ; 80 souches étaient productrices de BLSE avec plusieurs gènes de résistance aux aminosides et aux quinolones, parmi lesquelles 23 souches hébergeaient le gène 16S ARNr méthyltransférase *armA* ; cela a été rapporté pour la première fois en Algérie. De plus, nous avons pu identifier par MLST un groupe de huit souches appartenant au clone ST39 parmi les 23 souches, qui a été isolé en pédiatrie entre le mois de Février et Juin 2010, ce qui suggère qu'une épidémie nosocomiale avait eu lieu dans ce service.

Il convient donc de souligner que l'émergence de tel clone multirésistant qui est à l'origine de l'épidémie est inquiétante car cela a déjà limité les options du traitement de ce type d'infections. En définitive, une politique de surveillance doit être mise en place dans nos hôpitaux afin de limiter l'émergence des carbapénèmases en Algérie.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*, résistance aux antibiotiques, BLSE, 16S ARNr méthyltransférase (*armA*), MLST.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen with high epidemic potential, frequently involved in severe infections. The increase and spread of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli, especially in *K. pneumoniae* is a major public health problem. The aim of this study was to evaluate and characterize the genetic support of antibiotic resistance of strains of *K. pneumoniae* isolated in different hospital units of the University Hospital of the city of Annaba in 2010 and 2011.

First, the identification of 100 strains of *K. pneumoniae* was performed by API 20E and confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Then the antibiotic susceptibility tests (disk diffusion method on agar and MIC by E. Test) were performed according to the recommendations of the French Society for Microbiology. Phenotypic research of the production of β -lactamases extended spectrum (ESBL) was also performed. Furthermore, the antibiotic resistance genes have been characterized by molecular biology techniques (PCR and sequencing). In addition, the transferability of resistance determinants was tested by conjugation experiments using *E. Coli J53* as the recipient strain. Finally, the study of clonal relationship between multiresistant strains was determined by Multi-Locus Sequence Typing (MLST).

The results of this study showed a high resistance of clinical isolates of *K. pneumoniae* to the majority of antibiotics clinically used particularly to β -lactam; 80 strains were ESBL-producing with several resistance genes to aminoglycosides and quinolones, among which 23 strains harbored the 16S rRNA methyltransferase gene *armA*; this has been reported for the first time in Algeria. In addition, we identified by MLST a group of eight strains belonging to clone ST39 among the 23 multiresistant strains, which was isolated in pediatrics between the months of February and June 2010, suggesting that nosocomial outbreak had occurred in this unit.

It should therefore be emphasized that the emergence of such multiresistant clone which is the origin of the epidemic is worrisome because it has limited treatment options for this type of infections. Finally, a surveillance should be implemented in our hospitals to limit the emergence of carbapenemases in Algeria.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, ESBL, 16S rRNA methyltransferase (*armA*), MLST.

ملخص

Klebsiella pneumoniae هو ممرض انتهازى ذو احتمالية وباء مرتفعة والمتسبب في التهابات خطيرة. زيادة وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين عصيات الغرام سلبى لا سيما *Klebsiella pneumoniae* هو مشكلة صحية عامة كبرى. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم وتمييز الدعم الوراثية لمقاومة المضادات الحيوية لسلاسلات *Klebsiella pneumoniae* المعزولة في مختلف أقسام المستشفى الجامعي لمدينة عنابة في عام 2010 و2011.

في البداية تم تحديد 100 سلالة *Klebsiella pneumoniae* بواسطة $Api\ 20^E$ وأكد ذلك قياس الطيف الكتلي (Maldi Tof. MS). وقد أجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (بطريقة نشر القرص على الأجار وتحديد الحد الأدنى للتركيزات المثبطة بواسطة (E. Test) وفقا لتوصيات الجمعية الفرنسية لعلم الأحياء الدقيقة. وقد أجريت أيضا أبحاث مظهرية لانتاج البيتا لاكتاماز المتمدد الطيف (BLSE). كما تم التعرف على الجينات المسؤولة على المقاومة للمضادات الحيوية بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية (PCR, Séquençage). بالإضافة إلى ذلك تم اختبار نقل محددات المقاومة من خلال تجارب اقتران باستخدام *E. coli J53* كسلالة متقلبة. أخيرا تمت دراسة العلاقة بين السلالات المتعددة المقاومة بواسطة Multi Locus Sequence Typing (MLST).

أظهرت نتائج هذه الدراسة وجود مقاومة عالية من طرف العزلات السريرية *Klebsiella pneumoniae* لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة خاصة اتجاه البيتا لاكتامين (β -lactamines)؛ وكانت 80 سلالة منتجة لـ BLSE وكذلك عدة جينات مقاومة Aminosides و Quinolones، من بينها 23 سلالة منتجة *ARNr Methyltransférase* 16 S الجين *armA*، وهذا ما تم اكتشافه للمرة الأولى في الجزائر. بالإضافة إلى ذلك استطعنا تحديد بواسطة MLST مجموعة من 08 سلالات تنتمي إلى الاستنساخ Clone ST 39 من بين 23 سلالة متعددة المقاومة والتي كانت معزولة في وحدة طب الأطفال بين شهري فيفري وجوان 2010 مما يدل على حصول تفشي وباء مستشفيات في هذه الوحدة.

ولذلك ينبغي التأكيد على أن ظهور مثل هذا الاستنساخ المتعدد المقاومة لمضادات الحيوية والذي يعد السبب في الوباء هو أمر خطير لأنه قد حدد خيارات العلاج من هذه الالتهابات ولهذا يستلزم وضع سياسة مراقبة في مستشفياتنا للحد من ظهور Carbapenemase في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: *Klebsiella pneumoniae*، المقاومة للمضادات الحيوية، BLSE، *ARNr Methyltransférase* 16 S (armA)، MLST.

Annexe 2

Article publié

- **Outbreak of an armA Methyltransferase-Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital.**

Zineb Belbel, Houria Chettibi, Mazouz Dekhil, Ali Ladjama, Sabrina Nedjai, and Jean-Marc Rolain. *Microbial Drug Resistance*. January 29, 2014.

Nom du journal : **Microbial Drug Resistance**

Pays du journal : **Etats-Unis**

Impact Factor : **2.364 ***

*2012 Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2013

Editor: Alexander Tomasz, PhD

ISSN: 1076-6294 • Published Bimonthly •

Online ISSN: 1931-8448

Outbreak of an *armA* Methyltransferase-Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital

Zineb Belbel,^{1,2} Houria Chettibi,² Mazouz Dekhil,³ Ali Ladjama,² Sabrina Nedjai,³ and Jean-Marc Rolain¹

Here we report an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infections harboring extended spectrum β -lactamases (ESBL) and *armA* 16S rRNA methylase that were detected in pediatric and neonatal intensive care units during the 2010 and 2011 surveys of 100 clinical strains of *K. pneumoniae* from Annaba hospitals in Algeria. Antibiotic susceptibility testing was performed using the disk diffusion method. Minimum inhibitory concentrations of three classes of antibiotics were determined using the E. test. Standard polymerase chain reaction amplification and sequencing were performed using primers targeting ESBL, 16S ribosomal RNA (rRNA) methyltransferases, aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), and quinolone encoding genes. Clonal relationships among the clinical isolates were performed using multilocus sequence typing. From our clinical isolates, we found high rates of antimicrobial resistance that were linked to the presence of different ESBL encoding genes and AMEs, including 23 strains that harbored several ESBL encoding genes along with the 16S rRNA methyltransferase *armA*. Among these isolates, we identified a cluster of eight isolates of the ST39 clone between February and June 2010 in a pediatric ward, suggesting that an outbreak had occurred during this period. In conclusion, the emergence of multidrug-resistant clones, which were likely responsible for a nosocomial outbreak, is worrying because there are already limited options in those critical situations. Finally, we believe that surveillance should be implemented to monitor the risk of emergence and spread of carbapenemases in Algeria.

Introduction

KLEBSIELLA PNEUMONIAE is an important opportunistic pathogen that is known to cause urinary tract infections, respiratory diseases, bacteremia, and secondary infections of surgical wounds.⁷ *K. pneumoniae* is the most common causative bacterial agent of neonatal infections in hospitalized immunocompromised patients admitted to neonatal intensive-care units, where it can cause outbreaks of infections resulting in adverse outcomes, including death, in affected infants as well as higher healthcare costs.²⁰ *K. pneumoniae* has a demonstrated ability to acquire plasmids expressing extended spectrum β -lactamases (ESBL), which frequently possess resistance factors for other classes of antibiotics, notably aminoglycosides, fluoroquinolones, and trimethoprim/sulfamethoxazole.⁷ Furthermore, several carbapenemase encoding genes have been described in *K. pneumoniae* species, including class A β -lactamase KPC, class B β -lactamases NDM, IMP, and VIM, and class D

β -lactamase OXA-48.⁷ Aminoglycosides are still widely used to treat severe bacterial infections, and they are often used synergistically with β -lactams.²⁸ Resistance to aminoglycosides has been attributed mainly to enzymatic inactivation by aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), which are classified into acetyltransferases, nucleotidyltransferases, and phosphotransferases.¹⁷ Methylation of the 16S ribosomal RNA (rRNA) has recently emerged as a new mechanism of resistance against aminoglycosides among gram-negative pathogens. This modification confers high-level resistance to all clinically relevant aminoglycosides.²⁸ Since the identification of *K. pneumoniae* clinical isolates producing 16S rRNA methylases in France in 2003,¹⁴ ten 16S rRNA methyltransferase genes (*armA*, *mntA*, *mntB*, *mntC*, *mntD*, *mntE*, *mntF*, *mntG*, and *mntH*) have been reported.¹¹ *ArmA* and *mntB* are the most frequently identified methylases in *Enterobacteriaceae*, and they are a global concern.²⁸ The genes encoding these methyltransferases are usually located on transferable plasmids,

¹Unité de Recherche sur Aix-Marseille Université, Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), UM63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille, France.

²Département de Biochimie, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

³Laboratoire central de Microbiologie, CHU Dorban de Annaba-Algérie, Annaba, Algérie.

and they can coexist with ESBL, *qnr*, *AmpC* and, recently, with the NDM-1 determinant,¹⁷ contributing to multidrug-resistant phenotypes, which are a considerable threat to medical security.

Comprehensive characterization of multidrug-resistant (MDR) *K. pneumoniae* has been carried out in many parts of the world, but little information is available from Algeria.²⁷

In this study, the molecular characterization of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates and their co-occurrence with 16S rRNA methylases and AMEs from Annaba Hospital (East Algeria) were undertaken, along with multilocus sequence typing (MLST) to determine the clonal relatedness of clinical isolates.

Materials and Methods

Bacterial strains and species identification

We analyzed 100 independent *K. pneumoniae* isolated from different samples (blood, urine, and pus) during 2010 and 2011 at three university hospitals in Annaba. The strains were grown on MacConkey agar and incubated at 37°C for 18–24 hr. Preliminary identification of the isolates was performed using the API 20 E system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and confirmed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) (Microflex TM, Bruker Daltonic, Bremen, Germany) with flex control software (Bruker Daltonic) as previously described.²⁴

Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibility was tested with a disk diffusion assay on Mueller-Hinton agar. The results of the susceptibility testing were interpreted according to the recommendations of the committee of the French society for microbiology (CA-SFM). The phenotypic detection of the ESBL-secreting strains among the 100 identified *K. pneumoniae* strains was performed with the synergy test using a central amoxicillin + clavulanic acid disk, 30 mm away from cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidim, aztreonam, and cefepime disks. The presence of ESBL was demonstrated by a "champagne cork" aspect. For cephalosporinase hyperproduction, the synergy test was also performed on Muller-Hinton agar containing 250 mg/ml of cloxacillin. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for ESBL-KP of three antibiotic classes were determined using an E. test.

Molecular detection of MDR *K. pneumoniae* encoding genes

Standard polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing were performed using previously published primers to amplify the genes coding for ESBL (*bla-SHV*, *bla-TEM*, and *bla-CTX-M*),^{8,12,20} genes coding for AMEs [*aac*, *aac(6)-Ib*, *aph(3)*, and *ant(2)*],¹⁹ genes coding for 16S rRNA methyltransferase *armA*,¹⁹ the *mt* variants (*mtA*, *mtB*, *mtC*, *mtD1*, *mtD2*, *mtE*, *mtF*, *mtG*, and *mtH*) designed in this study, and genes coding for resistance to fluoroquinolones (*qnrA*, *qnrB*).²⁶ The PCR products positive from genes were sequenced using the Big Dye Terminator[®] system on an automated ABI 3730 sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). The gene sequences obtained were aligned and compared with those in GenBank using

BlastN and BlastP against the NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Conjugation experiment

To test the transferability of the resistance determinants to the azide-resistant *Escherichia coli* strain J53, we selected five *armA*-positive strains that were employed as putative donors for use in a conjugation assay using the broth mating method. The transconjugants were selected on LB agar plates supplemented with amikacin (100 µg/ml) and sodium azide (200 µg/ml). After incubation, the culture was characterized using MALDI-TOF-MS. PCRs for *bla-CTX-M* and *armA* from transconjugant strains were performed using the primers described previously. Disk diffusion susceptibility testing and the MICs of amikacin, gentamicin, and cefotaxime for donors, transconjugants, and recipients were measured in accordance with CA-SFM guidelines.

Multilocus sequence typing

The MLST analysis of 23 *armA*-producing *K. pneumoniae* strains using seven housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, and *tonB*) was performed according to the protocol described on the *K. pneumoniae* MLST website (www.pasteur.fr/mlst). The sequence types (STs) were assigned using database tools.

Results

Bacterial strain and species identification

A total of 100 clinical isolates of *K. pneumoniae* collected from 100 patients were identified using the API 20E commercial test and confirmed by MALDI-TOF-MS, with score values ranging from 1.9 to 2.3. Among the 100 strains studied, 80 (80%) were ESBL producers. The distribution of ESBL *K. pneumoniae* strains according to age, sex, hospital ward, and type of sample is provided in Table 1.

Antimicrobial susceptibility

Disk diffusion susceptibility testing and MICs of the ESBL-producing *K. pneumoniae* indicated a high prevalence of resistance to various antimicrobial agents, especially the β-lactams amoxicillin/clavulanic acid (81.25%) and cefoxitin (5%), and all of these were highly resistant to cefotaxime, with MICs ranging from 64 to more than 512 mg/ml, and those for ceftazidime ranging from 4 to 64 mg/ml. The results of the double-disk synergy test for the 80 *K. pneumoniae* clinical isolates studied were also positive. The resistance of the strains to aminoglycosides and fluoroquinolones was also remarkable: 54 strains (67.5%) were resistant to gentamicin (with MICs ranging from 12 to >256 mg/ml) and 47 (58.75%) to amikacin (MICs ranging from 1.5 to >256 mg/ml). Finally, 56 (70%) of the strains were resistant to ciprofloxacin and 65 (81.25%) to trimethoprim/sulfamethoxazole. None of the strains were resistant to imipenem or colistin.

Molecular detection of MDR *K. pneumoniae* encoding genes

Out of 80 ESBL *K. pneumoniae* strains, the CTX-M type was detected in 76 (95%) of the isolates, 75 of which were

TABLE 1. PHENOTYPIC FEATURES OF THE ESBL KLEBSIELLA PNEUMONIAE (N=80) CLINICAL ISOLATES

Parameters	n	%
Sex		
Male	35	43.75
Female	45	56.25
Total	80	100
Age (years)		
0-3	43	53.75
3-15	5	6.25
15-50	15	18.75
>50	17	21.25
Total	80	100
Hospital service		
Pediatric and neonatal	46	57.5
Intensive care unit		
Intensive care	6	7.5
Endocrinology	10	12.5
Emergency	7	8.75
Ear nose and throat	5	6.25
Nephrology	1	1.25
Pneumology	1	1.25
Hematology	2	2.5
Infectious	2	2.5
Total	80	100
Type of sample		
Pus	23	28.75
Urine	23	28.75
Blood culture	18	22.5
Protected specimen brush	8	10
Skin sample	2	2.5
Cerebrospinal fluid	2	2.5
Urinary catheter	1	1.25
Lumbar puncture	3	3.75
Total	80	100

ESBL, extended spectrum β-lactamases.

CTX-M-15 (CTX-M-1 group) and 1 of which was CTX-M-38 (CTX-M-9 group). Seventy-three (91.25%) of the isolates harbored a SHV variant (SHV-133, SHV-1, SHV-11, SHV-12, SHV-33, SHV-28, SHV-1a, SHV-32, SHV-26, and SHV-2a), and 74 (92.5%) of them harbored a TEM-1 gene. Every single (100%) isolate produced more than one ESBL. The AME encoding genes detected included 50 (62.5%) *aac(6)-Ib-cr* and 35 (43.75%) *aad* (31, *aadA2*; 4, *aadA1*). Their simultaneous production was found in 12 strains of ESBL-*K. pneumoniae*. In our isolates of ESBL *K. pneumoniae*, we found that 23 (28.75%) of the strains harbored the 16Sr RNA methylase *armA* gene. These strains have demonstrated a high level of resistance to all aminoglycosides (MIC>256). No *rmt* genes were detected in our strains. The phenotypic and genotypic features of the 23 ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates are given in Table 2. The *qnrB-42* gene was found in 22 (27.5%) of the isolates, and it was always associated with the *aac(6)-Ib-cr* gene.

Conjugation experiment

Plasmid transfer to *E. coli* J53 was successful for five of the *armA* carrying strains tested. *ArmA*-positive conjugative plasmids were obtained, and they carried both *armA* and CTX-M, showing that the *K. pneumoniae* isolates harbored transferable ESBL and aminoglycoside resistance determi-

nants. The transconjugants had the same antibiotic susceptibility profile of donor strains, except that they were susceptible to rifampin. The MICs of the five transconjugants showed high levels of resistance to gentamicin and amikacin (MIC>256) and to cefotaxime (MIC>512).

Genetic relatedness

The MLST analysis was only performed for 23 *armA*-positive *K. pneumoniae* clinical isolates. We found 15 STs in these isolates, among which 11 STs were novel, and we identified a cluster of 8 isolates of the ST39 clone between February and June 2010 in a pediatric ward, suggesting that an outbreak occurred in this unit (Fig. 1).

Discussion

ESB-producing *K. pneumoniae* have been associated with adverse clinical outcomes, including increased mortality, prolonged hospital stays, and increased economic costs.²³ In this study, we report a high rate (80%) of ESBL *K. pneumoniae* isolates collected in 2010 and 2011 in an Annaba hospital. This rate is similar to that found in a study comparing the rate of ESBL in Algeria (88.6%) to that of France (26.8%) in 2011.⁷ Our results confirm a high rate of ESBL in Algeria and further demonstrate the worldwide spread of CTX-M-15 enzymes in clinical isolates. We notice a worldwide north to south gradient evolution of ESBL production rate in *K. pneumoniae* strains.⁷ In our study, the diversity of ESBL was due to the persistence of previously identified enzymes and the emergence of new enzymes in our geographical area (SHV-133, SHV-1a, SHV-2a, SHV-33, SHV-26, and SHV-32), and we also report the first isolation of CTX-M-38 (a member of the CTX-M group 9) in Africa. This type of ESBL was previously reported only in Asia (China) in strains of *E. coli*.¹⁸ Our study reports the first detection of the *qnrB-42* gene, which confers resistance to quinolones in Algeria, in 22 (27.5%) isolates; this type was previously detected in 2012 in France.¹⁶ The *qnrB* genes were always associated with the *aac(6)-Ib-cr* variants, but the latter was more frequently detected [in 50 (62.5%) ESBL *K. pneumoniae* isolates], and this variant simultaneously confers resistance to aminoglycosides and ciprofloxacin. Our study presents the first report of the *armA* 16Sr RNA methylase in 23 clinical isolates of ESBL-producing *K. pneumoniae* in Algerian hospitals. Notably, the *armA* gene was isolated from *K. pneumoniae* strains in four hospitalized patients of Algerian origin during a survey of Belgian hospitals in 2000 and 2005.⁹ The *armA* gene has also been reported in *Salmonella* species in Algeria.²² Recently, the *armA* gene was identified in combination with the NDM-1 gene among *K. pneumoniae* strains in Nepal.²⁵ Our rate (28.8%) of the 16S rRNA methylase *armA* gene is higher than that found among ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Greece (0.2%) in 2009¹³ and in France (1.3%) in 2007.⁶ However, it remains lower than that found among MDR *K. pneumoniae* in China (54.5%) in 2009.³⁰ The 16S rRNA methylase seems to be more prevalent in Asia than in Europe and in America.¹³

Our study reports 15 clones of *K. pneumoniae* that circulated in an Algerian hospital, and moreover, we have identified a cluster of ST39 clones that suggest an outbreak of *K. pneumoniae* harboring both ESBL and *armA* genes in pediatric and NICU. This epidemic clone, ST39, was previously

TABLE 2. PHENOTYPIC AND GENOTYPIC FEATURES OF THE 23 ARM A PRODUCING *K. PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES

Strain	Sampling	Age	Sex	Date	Service	bla-SHV	bla-TEM	bla-CTX-M	16S methylase	AAD	AAC (6)	QNRB	ST
Kp9	Urine	22 years	M	01/02/2010	Intensive care	SHV-1a	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	AAC (6)-Ib-cr	-	1389
Kp1	CSF	3 years	M	02/02/2010	Pediatric	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	AAC (6)-Ib-cr	-	1386
Kp15	Pus	8 days	F	07/02/2013	Pediatric	SHV-12	-	CTX-M-15	ARM-A	-	AAC (6)-Ib-cr	-	1393
Kp10	Urine	81 years	M	09/02/2010	Endocrinology	SHV-2a	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	AAC (6)-Ib-cr	QNRB-42	1390
Kp2	Blood	14 months	F	10/02/2010	Pediatric	SHV-133	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	-	AAC (6)-Ib-cr	-	13
Kp3 ^a	LP	2 months	M	11/02/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39
Kp11	Urine	17 days	M	16/02/2010	Pediatric	SHV-12	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A1	-	-	542
Kp5	Pus	73 years	M	20/02/2010	ENT	-	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	AAC (6)-Ib-cr	-	1387
Kp12 ^a	Urine	2 months	M	25/02/2010	Pediatric	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	1391
Kp6	Blood	13 months	F	28/02/2010	Pediatric	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	AAC (6)-Ib-cr	-	1388
Kp16	Pus	60 years	M	01/03/2010	Endocrinology	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	1391
Kp4	LP	10 days	M	01/03/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39
Kp17	PSB	2 years	M	02/03/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39
Kp13	Urine	20 days	M	03/03/2010	Pediatric	SHV-12	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A1	-	-	759
Kp14	Urine	1 year	F	07/03/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	-	AAC (6)-Ib-cr	-	1392
Kp18	Skin S	1 year	M	08/03/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39
Kp19 ^a	PSB	6 days	M	29/03/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39
Kp7	Blood	4 months	F	01/04/2010	Pediatric	SHV-33	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	AAC (6)-Ib-cr	-	1386
Kp20	Pus	15 days	F	25/04/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39
Kp8 ^a	Blood	7 months	F	01/06/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39
Kp21	Pus	1 month	F	10/06/2010	Pediatric	SHV-32	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	1395
Kp22	Pus	59 years	F	20/06/2010	Emergency	SHV-11	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	-	-	-	1392
Kp23 ^a	PSB	1 year	F	29/06/2010	Pediatric	SHV-1	TEM-1	CTX-M-15	ARM-A	AAD-A2	-	-	39

^a Strains that have been conjugated in *Escherichia coli* 53.

M, male; F, female; CSF, cerebrospinal fluid; LP, lumbar puncture; Skin S, skin sample; PSB, protected specimen brush; IC, intensive care; ENT, ear, nose, and throat; ST, sequence type.

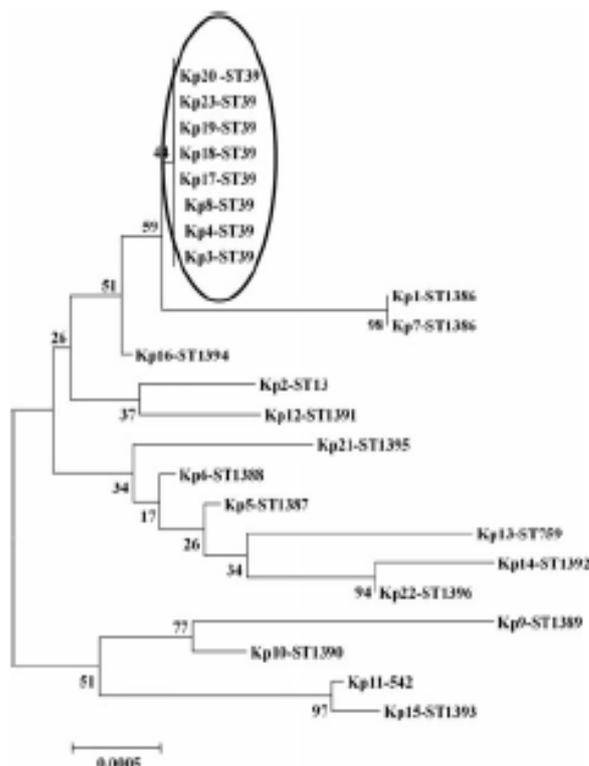


FIG. 1. Phylogenetic tree of multilocus sequence typing (MLST) of 23 *armA*-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates.

linked to the spread of an important OXA-48 outbreak in a neonatal unit in Israel.¹ A VIM-producing strain was also reported in a nosocomial outbreak in Spain,¹⁵ but it was not associated with *arm*-producing *K. pneumoniae* outbreaks.

The current outbreak lasted 5 months (February 2010 to June 2010) with the same ST39 clone, suggesting a common source of infection and transmission. In case-control studies, up to half of the previous investigations for the source of such prolonged outbreaks remained unidentified.²⁰ This difficulty can be linked to *K. pneumoniae*'s ability to survive in the environment and be a source of contamination from patient to patient passing through the hands of healthcare workers.²⁰ Furthermore, neonates are particularly susceptible hosts due to their immature immune systems and low birth weight, especially when invasive devices (a source of contamination) are used.²⁰ However, due to the paucity of available clinical data regarding the strains isolated from this unit, no source of infection was found.

The association of the 16S rRNA methylase and CTX-M-15 encoding genes on the same plasmid suggests exchange of this plasmid between different species, and this development may seriously compromise the clinical use of aminoglycosides combined with β -lactams to treat gram-negative infections.¹⁷ Thus, effective treatment should be selected according to antibiotic susceptibility testing to limit the use of carbapenems when possible. Indeed, carbapenem compounds are increasingly used worldwide and that has led to an increase in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (mainly by dissemination of carbapenemases). The emergence of carbapenemases has been demonstrated in many parts of the world, including North Africa and Algeria.

Oxacillinases and NDM-1 carbapenemases have been reported in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Algeria^{3,10,21,22} as well as *K. pneumoniae* producing OXA-48 in association with NDM-1 in Morocco, Tunisia.^{4,5}

In conclusion, the emergence of such multidrug-resistant clones that are likely responsible for nosocomial outbreaks is worrying because there are already limited options for the treatment of these types of bacterial infections. We believe that the risk of emergence and spread of carbapenemases in Algeria merits the implementation of surveillance. Finally, screening for MDR bacteria using rectal, throat, and wound swabs should be the rule when Algerian patients are hospitalized in Europe, especially in France.

Acknowledgments

The authors thank Linda Hadjadj for technical assistance and the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles, and/or isolates at www.pasteur.fr/mlst. The authors thank the American Journal of Experts for English corrections.

Disclosure Statement

All the authors disclose there are no commercial associations that might create a conflict of interest in connection with this study.

References

1. Adler, A., E. Solter, S. Masarwa, T. Miller-Roll, B. Abu-Libdeh, H. Khamash, K. Najem, S. Dekadek, C. Stein-Zamir, N. Nubani, A. Kunbar, M.V. Assous, Y. Carmeli, and M.J. Schwaber. 2013. Epidemiological and microbiological characteristics of an outbreak caused by OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Jerusalem, Israel. *J. Clin. Microbiol.* 51:2926-2930.
2. Baba Ahmed-Kazi, T.Z., D. Decre, N. Genel, Z. Boucherit-Otmani, G. Arlet, and M. Drissi. 2013. Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb. Drug Resist.* 19:185-190.
3. Bakour, S., M. Kempf, A. Touati, A. Ait Ameer, D. Haouchine, F. Sahli, and J.M. Rolain. 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two University Hospitals in Algeria. *J. Med. Microbiol.* 61(Pt 9):1341-1343.
4. Barguigna, A., O.F. El, Y.F. Lakkakbi El, M. Talmi, K. Zerouali, and M. Timinouni. 2013. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *APMIS* 121:675-677.
5. Ben, N. A., D. Decre, F. Compain, N. Genel, F. Barguelli, and G. Arlet. 2013. Emergence of NDM-1 in Association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:4089-4090.
6. Bercot, B., L. Poirel, and P. Nordmann. 2008. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:4526-4527.
7. Berrazeg, M., S.M. Diene, M. Drissi, M. Kempf, H. Richez, L. Landraud, and J.M. Rolain. 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One.* 8:e61428.

8. Birkett, C.I., H.A. Ludlam, N. Woodford, D.F. Brown, N.M. Brown, M.T. Roberts, N. Milner, and M.D. Curran. 2007. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J. Med. Microbiol.* **56**:52–55.
9. Bogaeys, P., M. Galimand, C. Bauraing, A. Deplano, R. Vanhoof, M.R. De, H. Rodriguez-Villalobos, M. Struelens, and Y. Glupczynski. 2007. Emergence of ArmA and RmlB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:459–464.
10. Decousser, J. W., C. Jansen, P. Nordmann, A. Emirian, R.A. Bonnin, L. Anaïs, J.C. Merle, and L. Poirel. 2013. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro. Surveill.* **18**:20547.
11. Deng, Y.T., Z.L. Zeng, W. Tian, T. Yang, and J.H. Liu. 2013. Prevalence and characteristics of rmlB and qepA in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Front. Microbiol.* **4**:198.
12. Essack, S.Y., L.M. Hall, D.G. Pillay, M.L. McFadyen, and D.M. Livermore. 2001. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:88–95.
13. Galani, I., M. Souli, T. Panagea, G. Poulakou, K. Kanelakopoulou, and H. Giamarellou. 2012. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**:E52–E54.
14. Galimand, M., P. Courvalin, and T. Lambert. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2565–2571.
15. Gijon, D., T. Curiao, F. Baquero, T.M. Coque, and R. Canton. 2012. Fecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* **50**:1558–1563.
16. Guillard, T., C.C. De, H. Moret, X. Bertrand, J.M. Scheffel, and E. Cambau. 2012. High-resolution melting analysis for rapid characterization of qnr alleles in clinical isolates and detection of two novel alleles, qnrB25 and qnrB42. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:2635–2639.
17. Hidalgo, L., K.L. Hopkins, B. Gutierrez, C.M. Ovejero, S. Shukla, S. Douthwaite, K.N. Prasad, N. Woodford, and B. Gonzalez-Zorn. 2013. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmlF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:1543–1550.
18. Ho, P.L., R.C. Wong, K.H. Chow, K. Yip, S.S. Wong, and T.L. Que. 2008. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **41**:428–432.
19. Kim, J.Y., Y.J. Park, H.J. Kwon, K. Han, M.W. Kang, and G.J. Woo. 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**:479–483.
20. Maltezou, H.C., E. Papacharalambous, K. Tryfinopoulou, L. Ftika, A. Maragos, G. Kyriakeli, P. Katerelos, C. Trakateli, M. Polemis, E. Roilides, A. Vatopoulos, and N. Nikolaidis. 2013. Outbreak of pan-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Scand. J. Infect. Dis.* **45**:872–877.
21. Mesli, E., M. Berrazeg, M. Drissi, S.N. Bekkhoucha, and J.M. Rolain. 2013. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int. J. Infect. Dis.* **17**:e739–e743.
22. Naas, T., C. Bentchouala, S. Lima, A. Lezzar, F. Smati, J.M. Scheffel, and P. Nordmann. 2009. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* Senftenberg isolates from Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:866–868.
23. Schwaber, M.J., and Y. Carmeli. 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:913–920.
24. Seng, P., J.M. Rolain, P.E. Fournier, S.B. La, M. Drancourt, and D. Raoult. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* **5**:1733–1754.
25. Tada, T., T. Miyoshi-Akiyama, R.K. Dahal, S.K. Mishra, H. Ohara, K. Shimada, T. Kirikae, and B.M. Pokhrel. 2013. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmlC and RmlF) in Nepal. *Int. J. Antimicrob. Agents* **42**:372–374.
26. Tourati, A., L. Brasme, S. Benallaoua, A. Gharout, J. Madoux, and C.C. De. 2008. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **60**:287–290.
27. Tourati, M., S.M. Diene, A. Racherache, M. Dekhil, A. Djahoudi, and J.M. Rolain. 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.
28. Wachino, J., and Y. Arakawa. 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist. Updat.* **15**:133–148.
29. Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:53–56.
30. Yang, J., L. Ye, W. Wang, Y. Luo, Y. Zhang, and L. Han. 2011. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes armA and rmlB amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**:348–351.

Address correspondence to:

Jean-Marc Rolain, PharmD, PhD

Unité de Recherche sur Aix-Marseille Université

Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales

Emergentes (URMITE)

UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095

IHU Méditerranée Infection

Faculté de Médecine et de Pharmacie

27 Bd Jean Moulin

13385 Marseille Cedex 05

France

E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr