

الجمهورية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUÉES



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

THEME

**Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques des bactéries
isolées du service de chirurgie urologique au CHU d'Annaba**

Présentée par : Mme BRAHMIA Safa

Directrice de thèse : Mme NEDJAI Sabrina

Professeur, Université d'Annaba

Membre du jury :

Présidente : Mme ABDI Akila

Professeur, Université d'Annaba

Examinatrices : Mme BOUDIAF Zahira

MCA, Université d'Annaba

Mme BOUACHA Mabrouka

MCA, Université d'Annaba

Mme BOUZAHOUANE Hana

MCA, Université de Souk Ahras

Invité : Mr. ROLAIN Jean Marc

Professeur, Université d'Aix-Marseille

Année universitaire : 2021-2022

Louanges à

Allah...

Allah le miséricordieux, qui m'a doté de volonté, du courage, de force et de patience pour pouvoir continuer dans les moments les plus difficiles... de m'avoir aidé à franchir tous les obstacles, me permettant de mener à terme ce modeste travail.

« يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ »

سورة المجادلة الآية ١١

DEDICACE

*Je dédie cette thèse.....A la mémoire de celle qui
m'a mis au monde, ma très chère
MIMA, nous n'avons pas eu la chance de
partager la joie de mes succès, mais je suis
certaine que tu aurais été fière de ta petite fille
qui va te rapporter le titre
de Docteur....*

*tu es partie en laissant un grand vide dans ma
vie et un grand chagrin... si seulement tu étais
à mes côtés pour partager ce jour avec moi*

ربي يرحم امي الغالية

Safa

Remerciements

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans la collaboration de plusieurs personnes et organismes qui m'ont soutenue au cours de cette grande aventure.

C'est pour cela, ces lignes sont peut-être les plus faciles et les plus difficiles que je dois écrire... il paraît simple de nommer toutes les personnes qui m'ont aidé, mais il sera difficile de les remercier assez... Je vais néanmoins essayer...

Mes plus vifs remerciements vont à

ma chère directrice de thèse Pr NEDJAI Sabrina, qui par son expérience et son enthousiasme, m'a permis de surmonter les difficultés.

Je témoigne ma reconnaissance à Mme ABDI A., Professeur à l'université d'Annaba, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury.

Je remercie vivement, Mme BOUDIAF Z, Maître de conférences A, Faculté de médecine, Mme BOUACHA M, Maître de conférences A à l'université d'Annaba, Mme BOUZAHOUANE H., Maître de conférences A à l'université de Souk Ahras, pour avoir accepté de juger ce modeste travail. J'ai eu la chance d'être votre étudiante pendant mon parcours universitaire. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie profondément

Mon tuteur de stage, Mr ROLAIN J.M., Professeur à l'université d'Aix-Marseille, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire tout en mettant à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de

*mon travail . A ses côtés, j'ai pu bénéficier de ses précieux conseils, de son sens critique, de sa rigueur dans le travail et de sa curiosité ce qui m'a permis d'accomplir ce travail. Je ne saurais oublier ses lectures et corrections de ma publication. Je suis également reconnaissante à tout le staff du laboratoire et surtout **Melle. HADJADJ L.** pour son aide technique.*

Un merci particulier aux

*Docteurs **BAKOUR Sofiane, LALAOUI Rym**, je vous remercie du fond de mon coeur de m'avoir fait partager votre expérience, pour vos encouragements et votre compréhension. Ce fut très agréable de travailler avec vous tous ; des moments que je garderai précieusement dans mes souvenirs.*

Je remercie également

*Le personnel du laboratoire de microbiologie CHU d'Annaba, **Fatma, Aïcha, Karima**, trouvez ici le témoignage de ma profonde reconnaissance pour vos encouragements, votre aide et votre amitié.*

Merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin par un simple geste ou un mot d'encouragement.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à mes raisons de vivre...

*Mon héros **Papa**, Je sais qu'un simple merci ne suffit pas pour t'exprimer toute ma gratitude, et mon amour. Je te remercie pour le soutien inconditionnel, moral et financier, je te remercie d'être toujours là pour moi. Que dieu te garde pour nous, saches que ta*

filles survive grâce à la fierté qu'elle voit dans tes yeux... Que tu le sois à JAMAIS

*Je tiens à remercier également mes frères, **Abdelhak, Ameer, khalil** et bien sur mon jumeau **Hamza**, qui m'ont toujours encouragée et aidée dans toutes les recherches de mon parcours avec beaucoup de dévouement de tendresse et surtout d'amour et d'affection, qui ont toujours éclairé mon chemin.*

*A mes belle-sœurs **Amira et Nina et Hannane**, mes neveux **Badreddine, yanis, Ilyan**, mes nièces **Daríne et Camília***

*Un grand merci à ma belle mère **DAYA**, mes belles sœurs, mon beau frère **Ismaíl**;*

*Mes remerciements finaux et non les moindres vont à mon mari **Hichem** qui a supporté mes humeurs au gré de cette thèse, qui m'a aidée sur les nombreux fronts de la vie quotidienne, qui m'a encouragée jusqu'au bout, qui a été mon appui tout simplement.*

*Enfin, a mes chères filles « **Fatma et Fraah** », aucune dédicace, ne peut valoir pour exprimer toute ma tendresse et mon affection vis-à-vis d'elles, mes filles car le fait de savoir qu'elles sont là me donner davantage le courage et la volonté de mener à bien mes travaux.*

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE IGÉNÉRALITÉS SUR LES INFECTIONS NOSOCOMIALES EN UROLOGIE 3

1. RAPPEL SERVICE D’UROLOGIE : 3

2. DOMAINES D’ACTIVITÉ..... 3

3. RAPPEL ANATOMIQUE DU SYSTÈME URINAIRE 3

4. DÉFINITIONS 5

4.1 Infection urinaire 5

4.2 Infection urinaire nosocomiale..... 5

5. RÉSERVOIRS ET SOURCES..... 5

6. LES DIFFÉRENTS SITES D’INFECTION NOSOCOMIAL 6

6.1 Les infections à distance du site opératoire..... 6

6.2 Les infections du site opératoire : 6

7. QUI TRAITER ? 6

7.1 Sondes urinaires 6

7.2 Chirurgie de la voie urinaire 7

7.3 Chirurgie endoscopique 7

8. LES FACTEURS DE RISQUE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES UROLOGIQUES.....	7
8.1 État général du patient.....	7
8.2 Les facteurs de risque liés à l'agent infectieux	7
8.3 Durée du séjour préopératoire.....	8
9. MODES DE TRANSMISSION.....	8
9.1 Transmission par contact direct	8
9.2 Transmission par contact indirect	8
9.3 Les autres modes de transmission	8
10. LES MICRO-ORGANISMES EN CAUSE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES EN UROLOGIE	10
10.1Enterobacteriaceae.....	10
10.1.1Définition	10
10.1.2Habitat	10
10.1.3Classification :.....	11
10.1.4Caractères bactériologiques :	11
10.2Les bacilles à Gram négatif non fermentaires :.....	14
10.2.1Définition :	14
10.2.2Habitat :.....	14
10.2.3Classification :.....	14
10.2.4Caractères bactériologiques :	14
CHAPITRE II RAPPEL SUR LES ANTIBIOTIQUES ET MÉCANISMES DE RÉSISTANCES BACTIRIENNE	17
1. DÉFINITION DE L'ANTIBIOTIQUE.....	17
2. PRINCIPALES CLASSES ET FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES ET LEURS MODES D'ACTION	17

2.1 Les bêta-lactamines	17
2.2 Les aminosides	19
2.3 Les quinolones et fluoroquinolones	19
2.4 Les cyclines	20
2.5 Les phenicoles :	21
2.6 l'association sulfaméthoxazole-triméthoprimine:	21
2.7 Les Sulfamides:	21
3. LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCES BACTÉRIENNES AUX ANTIBIOTIQUES	22
3.1 La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries	22
3.1.1 La résistance aux β-lactamines	22
4. LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ LES BGN NON FERMENTAIRES.....	31
4.1 <i>Pseudomonas aeruginosae</i>	31
4.1.1 Résistance naturelle	31
4.1.2 Résistance acquise	31
4.2 <i>Acinetobactere baumannii</i> :	33
4.2.1 Résistance naturelle	33
4.2.2 Résistance acquise	33
CHAPITRE III EMERGENCE MONDIALE DES CARBAPÉNÈMASES	36
1. LES CARBAPÉNÈMASES DE CLASSE A D'AMBLER.....	36
2. LES CARBAPÉNÈMASES DE CLASSE B D'AMBLER.....	39
3. LES CARBAPÉNÈMASES DE CLASSE D D'AMBLER.....	41
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	43

1. LIEU ET PÉRIODE D'ÉTUDE :	43
2. CRITÈRES D'INCLUSION :	43
3. DONNÉES DES PATIENTS :	43
4. PRÉLÈVEMENTS ET TRANSPORTS :	43
5. COLLECTION ET CONSERVATION DES SOUCHES :	43
6. IDENTIFICATION	44
6.1 Identification par Api système (bioMérieux)	44
6.2 Identification des souches par spectrométrie de masse MALDI-TOF	44
7. ETUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES	49
8. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE PAR E-TEST	50
9. DÉTECTION PHÉNOTYPIQUE DES B-LACTAMASES	51
9.1 Recherche de la production des BLSE	51
9.2 Recherche de la production des carbapénèmases	52
9.2.1 Détection des carbapénèmases par le Carba NP test modifié	52
9.2.2 Détection de carbapénèmases par le test Hodge modifié	53
9.2.3 Détection des méttallo-B lactamases(MBL) : l'EDTA Test	54
10. RECHERCHE MOLÉCULAIRE DES B-LACTAMASES ET CARBAPENEMASES	54
10.1Extraction de l'ADN à partir des cultures bactériennes	55
10.2PCR en temps réel (RT-PCR)	56
10.3Polymérase Chaine Réaction (PCR) standard	60
10.4Electrophorèse sur gel d'agarose	63

10.5 Séquençage	64
10.5.1 Purification	65
10.5.2 PCR BigDay	65
10.5.3 Purification par Sephadex	66
10.5.4 Séquençage.....	66
10.5.5 Analyse des séquences	66
10.6 Typage des isolats	67
10.6.1 Biotypage par MALDI-TOF-MS	67
10.6.2 Génotypage par la méthode "Multi-locus séquence typing" (MLST).....	67
11. TRANSFERT PAR CONJUGAISON	68
12. TRANSFORMATION	69
RÉSULTATS	70
2. DISCRPTION DE LA POPULATION	70
3. ASPECTS BACTÉRIOLOGIQUE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES DANS LE SERVICE D'UROLOGIE :	71
4. IDENTIFICATION DES SOUCHES BACTÉRIENNES	75
4.1 Identification différentielle.....	75
4.2 Identification biochimique	76
4.3 Identification par MALDI-TOF-MS	77
5. RÉPARTITION DES SOUCHES BACTÉRIENNES	77
5.1 Répartition des souches selon l'espèce :	77
5.2 Répartition des souches selon le sexe :	78
5.3 Répartition des souches selon l'âge :	79
5.4 Répartition des souches selon la nature de prélèvement :	80

6. BACILLES À GRAM NÉGATIF NON FERMENTAIRES.....	81
6.1 Origine et identification des souches isolées	81
6.2 Répartition des souches bactériennes.....	85
6.3 L'étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	89
6.3.1 Antibiogramme par diffusion de disques sur un milieu gélosé.....	89
6.3.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test.....	91
6.4 Caractérisation génétique de la résistance des <i>A. baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i>	92
6.4.1 PCR en temps réel.....	92
6.4.2 Biotypage par MALDI- TOF MS	93
7. LES ENTÉROBACTÉRIES	95
7.1 Origine et identification des souches isolées	95
7.2 Répartition des souches bactériennes.....	100
7.3 L'étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	105
7.3.1 Antibiogramme par diffusion de disques sur un milieu gélosé.....	105
7.3.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'imipénème par E-test 109	
7.3.3 Recherche phénotypique des β -lactamases	110
7.4 Caractérisation génétique de la résistance des BGN aux β -lactamines.....	113
7.4.1 PCR en temps réel.....	113
7.4.2 PCR standard	113
7.4.3 Séquençage et analyse des séquences des gènes qui codent pour les BLSE et carbapénémases	117
7.5 Le typage moléculaire	118
7.5.1 Le biotypage par MALDI-TOF-MS	118
7.5.2 Génotypage par la méthode "Multi-locus séquence typing" (MLST)	121
7.6 Transfert par conjugaison et transformation.....	123

DISCUSSION 124

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 136

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 140

RÉSUMÉ(S) 22

ANNEXES 167

ARTICLE PUBLIÉ..... 172

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAC:** Aminoglycoside Acetyltransferases
ASA : American Society of Anesthesiologists
ADH : arginine dihydrolase
ADN: Acide desoxyribonucléique.
AmpC: céphalosporinases
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: Acide ribonucleique messenger
ARNr: Acide ribonucleique ribosomique
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: Adénosine Triphosphate
BET: Bromure d'éthidium
BGN: Bacilles à Gram négatif
BGN-NF : Bacilles à Gram négatif-Non fermentants
BGT : Bouillon glucosé tomponné
bla : beta-lactamase
BLSE: β -lactamase à spectre étendu
BMR: Bactérie multi-résistante
C1G : céphalosporines de 1^{ère} génération
C2G : céphalosporines de 2^{ème} génération
C3G : céphalosporines de 3^{ème} génération
C4G : céphalosporines de 4^{ème} génération
CHDL : carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase
CHU : Centre Hospitalo-universitaire
CLIN: Comité de lute contre les infections nosocomiales.
CMI: Concentration minimale inhibitrice
CT : Cycle threshold
ddNTP : Didésoxyribonucléotide
Dnase: Désoxyribonucléase
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
ERT-R : souche résistante à l'ertapénème
F: Forward
GES : Guyana extended spectrum (une bétalactamases à spectre étendu)
-

gyrA: Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

gyrB: Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

H2O UTP: Eau Ultra-Pure

IN : Infection Nosocomial

IPM- R : souche résistante à l'imipénème

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LDC : lysine décarboxylase

LPS: Lipopolysaccharide

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass spectrometry

MBLs : Métallo- β -lactamases

MCNP : Modified CARBA NP test

MDR: Multi drug resistant

MecA : gène de résistance à la méticilline.

MHT : Modified Hodge Test

Min: Minute

MLST : Multi Locus Sequence Typing

MSP: Mean spectra projection

NCBI : Genome database of the National Center for Biotechnology Information

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase

ODC: Ornithine Decarboxylase

OMS : organisation mondiale de la santé.

ONPG: Orthonitrophényl- β -galactoside

OprD : Outer membrane protein D

OXA : Oxacillinase

PCR: Polymerase chain reaction

PLP : protéine liant les pénicillines

PSM : Poste de sécurité microbiologique

R: Reverse (inverse)

Rpm: Rotation par minute

RT-PCR : Real time Polymerase Chain reaction

SHV: Sulfhydryl variable

ST : Séquence type

TBE: Tris-Broat-EDTA

TDA: Tryptophan Deaminase

TE : Tris-EDTA

TEM : Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

TFA : Acide TriFluorocétique

Tn : transposon

TSA : Trypticase Soja

UFC : unite formant colonie

USA : Etats-Unis d'Amérique

UV: Ultraviolet

VEB : Vietnam extended spectrum (une bêta-lactamase à spectre étendu)

VIM : Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase

VP: Réaction de Voges-Proskauer

Zn²⁺ : Zinc

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les résultats d'identification sous Biotyper	47
Tableau 2: Concentrations et diamètres critiques pour les entérobactéries	49
Tableau 3: Concentrations et diamètres critiques pour les BGN-NF.....	50
Tableau 4: Interprétation des résultats de MCNP	53
Tableau 5: Composition du mélange réactionnel pour les RT-PCR.....	56
Tableau 6: Amorces et sondes utilisées pour les PCR en temps réel.....	59
Tableau 7: Composition du mélange réactionnel pour les PCR standard.....	61
Tableau 8: Amorces utilisées pour les PCR standard	63
Tableau 9: Composition du mélange réactionnel pour la PCR BigDye.....	65
Tableau 10: Amorces pour les PCR du typage moléculaire chez <i>K. pneumoniae</i>	68
Tableau 11: Fréquence des prélèvements en fonction de leur positivité.....	71
Tableau 12: Répartition des prélèvements positifs en fonction du type de prélèvement.....	72
Tableau 13: Répartition des prélèvements positifs en fonction de la catégorie de germe	73
Tableau 14: Nombre et pourcentage des espèces bactériennes diagnostiquées en urologie ...	74
Tableau 15: répartition des souches isolées	75
Tableau 16: Répartition des souches selon le sexe	78
Tableau 17: Répartition des souches selon l'âge	79
Tableau 18: Répartition des souches selon la nature de prélèvement.....	80
Tableau 19: Caractérisation des souches d' <i>A. baumannii</i> en fonction de leur score MALDI-TOF	83
Tableau 20: Caractérisation des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fonction de leur score MALDI-TOF	84
Tableau 21: Répartition des souches bactériennes.....	85
Tableau 22: Répartition des patients infectés par <i>A.baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i> selon l'Age86	
Tableau 23: Répartition des patients infectés par <i>A.baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i> selon la période d'étude.....	87
Tableau 24: Répartition des patients infectés par <i>A.baumannii</i> selon la nature de prélèvement	88
Tableau 25: Répartition des patients infectés par <i>P. aeruginosa</i> selon la nature de prélèvement.....	88
Tableau 26: Caractérisation des <i>K. pneumoniae</i> isolées en fonction de leur score MALDI-TOF	96

Tableau 27: Caractérisation des <i>E.coli</i> isolées en fonction de leur score MALDI-TOF	98
Tableau 28: Caractérisation des <i>M.morganii</i> isolées en fonction de leur score MALDI-TOF98	
Tableau 29: Caractérisation des <i>Enterobacter cloacae</i> isolées en fonction de leur score MALDI-TOF.....	99
Tableau 30: Répartition des entérobactéries selon les espèces	100
Tableau 31: Répartition des patients infectés selon le sexe	101
Tableau 32: Répartition des patients infectés selon l'âge	102
Tableau 33: Répartition des patients infectés selon la période d'étude	103
Tableau 34: Répartition des patients infectés par les souches d'entérobactéries selon la nature de prélèvement	104
Tableau 35: Profile phénotypique et moléculaire des <i>K. pneumoniae</i> carba R	117
Tableau 36: Les STs des <i>K. pneumoniae</i> Carba-R.....	121

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Anatomie de l'appareil urinaire	4
Figure 2: Sites de colonisation des <i>Escherichia coli</i> pathogènes	12
Figure 3: Squelette d'une bêta lactamine	18
Figure 4: Structure de base des quinolones	20
Figure 5: Structure de base des cyclines	21
Figure 6: Structure schématique de la paroi bactérienne et de la membrane Cytoplasmique.	23
Figure 7: Les mécanismes de résistances aux ATBs.....	24
Figure 8: Distribution mondiale des EPC KPC.....	38
Figure 9: Prévalence géographiques des carbapénèmases de classe A et de leurs bactéries Gram négatives productrices de correspondants dans le bassin méditerranée.....	38
Figure 10: Distribution mondiale des EPC NDM	40
Figure 11: Prévalence géographiques des carbapénèmases de classe B et de leurs bactéries Gram négatives productrices de correspondants dans le bassin méditerranée	40
Figure 12: Distribution mondiale des EPC OXA-48-like	42
Figure 13: Prévalence géographiques des carbapénèmases de classe D et de leurs bactéries Gram négatives productrices de correspondants dans le bassin méditerranée.....	42
Figure 14: Protocole de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS.	48
Figure 15: Détermination de CMI par E-test.....	51
Figure 16: Interprétation du CARBA NP test modifié. A : Témoin négatif ; B : Solution contenant le rouge de phénol+imipénème à 6mg/ml+CTAB.....	53
Figure 17: Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénèmases.....	54
Figure 18: Extracteur EZ1 XL.....	55
Figure 19: Programme de la RT-PCR	56
Figure 20: Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®).....	58
Figure 21: Programme de la PCR standard	61
Figure 22 : Principe de la Polymerase chain reaction (PCR) standard	62
Figure 23: Programme de la PCR BigDye pour le séquençage	66
Figure 24: Fréquence des prélèvements en fonction de leur positivité	71
Figure 25: Répartition des prélèvements positifs en fonction du type de prélèvement	72
Figure 26: Répartition des prélèvements positifs en fonction de la catégorie de germe.....	73
Figure 27: Pourcentage des espèces bactériennes diagnostiquées en urologie	74
Figure 28: répartition des souches isolées	75

Figure 29: Exemple d'identification bactérienne obtenue de <i>K.pneumoniae</i> par les Api systèmes	76
Figure 30: Répartition des bacilles à Gram négatif selon les espèces	77
Figure 31: Répartition des espèces selon le sexe	78
Figure 32: Répartition des espèces selon l'âge	79
Figure 33: Répartition des souches par nature de prélèvements	80
Figure 34: Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF	82
Figure 35: Répartition des patients infectés par <i>P. aeruginosa</i> (1) et <i>A.baumannii</i> (2) selon le sexe.....	85
Figure 36: . Répartition des patients infectés par <i>A.baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i> selon l'Age	86
Figure 37: Répartition des patients infectés par <i>A.baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i> selon la période d'étude.....	87
Figure 38: Répartition des patients infectés par <i>A.baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i> selon la nature de prélèvement	88
Figure 39: Profil de résistance aux antibiotiques des <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> isolées des patients hospitalisés.....	89
Figure 40: . Antibiogramme d'une souche d' <i>A.baumannii</i> (A15) et <i>P. aeruginosa</i> (P04).....	90
Figure 41: Exemples d'E-test imipénème d'une souche d' <i>A. baumannii</i> (A17)et <i>P. aeruginosa</i> (03) résistante	91
Figure 42: Amplification par RT-PCR du gène bla _{OXA-58} , bla _{OXA-24} , bla _{OXA-23}	92
Figure 43: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des <i>A.baumannii</i>	93
Figure 44: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des <i>P. aeruginosa</i>	93
Figure 45: Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF.....	95
Figure 46: Répartition des entérobactéries selon les espèces	100
Figure 47: Répartition des patients infectés selon le sexe par : (01) <i>K.pneumoniae</i> ,(02,) <i>E.cloacae</i> (03) <i>E.coli</i> (04) <i>M.morganii</i>	101
Figure 48: Répartition des patients infectés par : (01) <i>K.pneumoniae</i> , (02) <i>M.morganii</i> , (03) <i>E.colacae</i> (04) <i>E.coli</i> selon l'âge	102
Figure 49: Répartition des patients infectés par : (01) <i>K.pneumoniae</i> , (02) <i>E.coli</i> , (03) <i>M.morganii</i> , (04) <i>E.clocae</i> selon la période d'étude	103
Figure 50: Répartition des patients infectés par les souches d'entérobactéries selon la nature de prélèvement	104
Figure 51: Profil de résistance aux antibiotiques des souches de <i>K. pneumoniae</i>	105
Figure 52: Profil de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>E.coli</i>	106

Figure 53: Profil de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>E.cloacae</i>	107
Figure 54: Profil de résistance aux antibiotiques des souches <i>M.morganii</i>	107
Figure 55: Exemples des antibiogrammes des entérobactéries multi-résistants	108
Figure 56: Exemples des CMI de souche de <i>K. pneumoniae</i> K42 résistantes à l'imipénème.....	109
Figure 57 : Exemple de synergie entre les C3G et l'AMC chez une souche de <i>K. pneumoniae</i>	110
Figure 58: Résultat positif <i>K. pneumoniae</i> (K11) d'MHT	111
Figure 59: Résultat positif <i>K. pneumoniae</i> du test MCNP.....	112
Figure 60: Amplification par RT-PCR du gène bla-KPC, bla-CTX-M, bla-TEM.....	114
Figure 61: Amplification par RT-PCR du gène bla-OXA48	115
Figure 62: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes blaCTX-M, blaTEM, et blaSHV.	115
Figure 63: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR de gène blaKPC et bla OXA-48	116
Figure 64: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des Enterobacteries.....	118
Figure 65: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des <i>K. pneumoniae</i>	119
Figure 66: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des <i>M.morgannii</i>	119
Figure 67: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des <i>E.coli</i>	120
Figure 68 : Répartition du <i>Klebsiella pneumoniae</i> produisant de l'OXA-48 et du KPC identifié dans différents hôpitaux algériens.	Erreur ! Signet non défini.

Résumé(s)

Les infections urinaires nosocomiales, à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, sont un problème majeur de santé publique. L'épidémiologie de ces infections dans le monde est marquée par la dissémination des bacilles à Gram négatif, hébergeant des gènes codant pour la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération et spécialement aux carbapénèmes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'apparition et de déterminer le support génétique de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries isolées du service de chirurgie urologique au CHU d'Annaba-Algérie.

Une collection de 114 souches (entérobactéries 83 (73%), et 31 (27%) aux groupes des bacilles à Gram négatif non fermentants) a été récupérée au cours d'une période de 3 années (janvier 2015 à décembre 2017). L'identification a été effectuée par le système Api et confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS). Ensuite, les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés selon European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Une recherche phénotypique de la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et de carbapénémases chez les BGN. Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par E-test. Les souches résistantes aux carbapénèmes ont été soumises aux différents tests phénotypiques : test d'Hodge, EDTA, et le Carba NP modifiée. La détermination des gènes de résistance ont été caractérisés par (PCR et séquençage) en utilisant: (*bla*_{TEM} , *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} et *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC} , *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} , *bla*_{OXA-58} , *bla*_{VIM}). Enfin, l'étude de la clonalité par la technique *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) et par biotypage de MALDI-TOF MS clustering.

Nos résultats mettaient en avant un haut niveau de résistance des isolats à la plupart des antibiotiques testés principalement aux β -lactamines. Vingt-sept sur 114 (23.68%) étaient résistants aux carbapénèmes. Parmi eux, 12 hébergent les gènes de carbapénémase : *bla*_{OXA-48} (11 *Klebsiella pneumoniae* et 1 *Enterobacter cloacae*), *bla*_{KPC-2} (3 *Klebsiella pneumoniae*), *bla*_{OXA-23} (10 *A. baumannii*) , *bla*_{OXA-24} (1 *A. baumannii*), *bla*_{OXA-58} (1 *A. baumannii*). d'autres β -lactamases aussi ont été détectés dans les 14 souches de *K. pneumoniae* *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}-(1-12), et *bla*_{TEM-1}.

L'analyse MLST a révélé deux ST différentes qui étaient attribuées aux 14 souches de *K.pneumoniae*, y compris ST 101 et ST 258. Le ST le plus couramment identifié (ST101) était détecté dans 11 isolats de *K.pneumoniae* producteurs d'OXA-48, alors que ST258 a été identifié dans les 3 KPC-2 produisant *K.pneumoniae*.

Il convient donc de noter la première description du gène KPC-2 produisant *K.pneumoniae* ST 258 en Algérie.

Par ailleurs, il est indispensable d'implanter de strictes stratégies de lutte contre les infections urinaires nosocomiales et la résistance aux antibiotiques ainsi qu'un programme d'hygiène sévère dans les hôpitaux algériens.

Mots clés : Infections urinaires nosocomiales, BMR, carbapénémases, BLSE

Abstract

Nosocomial urinary tract infections (UTIs), caused by bacteria that are multi-resistant to antibiotics, are a major public health problem. The epidemiology of these infections in the world is marked by the dissemination of Gram-negative bacilli, harboring genes coding for resistance to 3rd generation cephalosporins and especially to carbapenems.

The objective of this study is to evaluate the occurrence and to determine the genetic support of antibiotic resistance in bacteria isolated from the urological surgery department at the University Hospital of Annaba-Algeria.

A collection of 114 strains (Enterobacteriaceae 83 (73%), and 31 (27%) to the non-fermenting Gram-negative bacilli group) was recovered over a period of 3 years (January 2015 to December 2017). Identification was performed by the Api system and confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Then, antibiotic susceptibility testing was performed according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). A phenotypic investigation of the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and carbapenemases in BGN. Minimum inhibitory concentrations were determined by E-test. Carbapenem-resistant strains were subjected to the different phenotypic tests: Hodge test, EDTA, and the modified Carba NP. Determination of resistance genes were characterized by PCR and sequencing using: (*bla*TEM , *bla*SHV, *bla*CTX-M and *bla* OXA-48, *bla*KPC , *bla*NDM, *bla* OXA-23,*bla*OXA-24 , *bla*OXA-58 , *bla*VIM). Finally, the study of clonality by the Multi-locus Sequence Typing (MLST) and by MALDI-TOF MS clustering biotyping.

Our results highlighted a high level of resistance of isolates to most of the antibiotics tested mainly to β -lactams. Fourteen out of 114 (13.15%) were resistant to carbapenems. Of these, 12 harbored carbapenemase genes: *bla*OXA-48 (11 *Klebsiella pneumoniae* and 1 *Enterobacter cloacae*), *bla*KPC-2 (3 *Klebsiella pneumoniae*), *bla* OXA-23 (10 *A. baumannii*), *bla*OXA-24(1 *A. baumannii*), *bla*OXA-58(1 *A. baumannii*). Other β -lactamases were also detected in the 14 *K. pneumoniae* strains *bla*CTX-M-15, *bla*SHV-(1-12), and *bla*TEM-1.

MLST analysis assigned two different STs to the 14 *K. pneumoniae* strains, including ST 101 and ST 258. The most commonly identified ST (ST101) was detected in 11 OXA-48-producing *K.pneumoniae* isolates, whereas ST258 was identified in all 3 *K.pneumoniae*-producing KPC-2s.

It is therefore worth noting the first description of the KPC-2 gene producing *K.pneumoniae* ST 258 in Algeria.

Moreover, it is essential to implement strict strategies to control nosocomial urinary tract infections and antibiotic resistance as well as a severe hygiene program in Algerian hospitals.

Key words: Nosocomial urinary tract infections, BMR, carbapenemases, ESBL.

ملخص

تعد التهابات المسالك البولية في المستشفيات (UTIs) ، التي تسببها البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية ، مشكلة صحية عامة رئيسية. تتميز وبائيات هذه العدوى في العالم بانتشار العصابات سالبة الجرام ، والتي تؤوي ترميز الجينات لمقاومة الجيل الثالث من السيفالوسبورينات وخاصة الكاربابينيمات.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم مدى التواجد وتحديد الدعم الجيني لمقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا المعزولة من قسم جراحة المسالك البولية في مستشفى جامعة عنابة-الجزائر.

تم تحديد مجموعة من 114 سلالة (83 (73) Enterobacteriaceae) ، و 31 (27%) لمجموعة عصيات سالبة الجرام غير المخمرة) على مدى 3 سنوات (يناير 2015 إلى ديسمبر 2017). تم إجراء التحديد بواسطة نظام Api وتم تأكيده بواسطة مطياف الكتلة (MALDI-TOF-MS). بعد ذلك ، تم إجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية وفقاً للجنة الأوروبية لاختبار الحساسية لمضادات الميكروبات (EUCAST). تحقيق في النمط الظاهري لإنتاج-ctamases la ممتدة الطيف (ESBL) و carbapenemases في BGN. تم تحديد التركيزات المثبطة الدنيا بواسطة اختبار E-test. تعرضت السلالات المقاومة للكاربابينيم لاختبارات نمطية مختلفة: اختبار هودج ، EDTA ، و Carba NP المعدلة. تم تمييز جينات المقاومة بواسطة PCR والتسلسل باستخدام: (blaTEM و blaSHV و blaCTX-M و blaOXA-48 و blaKPC و blaNDM و blaOXA-23 ، blaOXA-24 ، blaOXA-58 ، blaVIM). أخيراً ، دراسة الاستنساخ عن طريق الكتابة التسلسلية متعددة المواضع (MLST) وعن طريق التنميط الحيوي للتجميع MALDI-TOF MS

سلطت نتائجنا الضوء على مستوى عالٍ من مقاومة العزلات لمعظم المضادات الحيوية المختبرة أساساً ل-β-lactam. أربعة عشر من أصل 114 (13.15%) كانت مقاومة للكاربابينيمات. من بين هذه الجينات ، 12 جيناً :

(1 *Enterobacter cloacae* ,11 *Klebsiella pneumoniae*) bla_{OXA-48} ,

(3 *Klebsiella pneumoniae*) bla_{KPC-2} , (10 *A. baumannii*) bla_{OXA-23}

(1 *A. baumannii*) bla_{OXA-24} , (1 *A. baumannii*) bla_{OXA-58},

تم اكتشاف إنزيمات بيتا لاكتامازات أخرى ، . bla_{TEM-1} , et bla_{SHV}-(1-12) , bla_{CTX-M-15} ,

حدد تحليل MLST سلالتين مختلفتين من سلالات *K. pneumoniae* ، بما في ذلك ST 101 و ST 258. تم اكتشاف (ST (ST101 الأكثر شيوعاً في 11 عزلة من *K. pneumoniae* المنتجة ل-OXA-48 ، في حين تم تحديد ST258 في جميع العزلات الثلاث. *K. pneumoniae* المنتجة ل-KPC-2

ذلك تجدر الإشارة إلى الوصف الأول للجين KPC-2 المنتج للجين ST 258 *K. pneumoniae* في الجزائر.

علاوة على ذلك، من الضروري تنفيذ استراتيجيات صارمة للسيطرة على التهابات المسالك البولية في المستشفيات ومقاومة المضادات الحيوية وكذلك برنامج النظافة الشديدة في المستشفيات الجزائرية.

الكلمات المفتاحية التهابات المسالك البولية في المستشفيات ، البكتيريا المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية ، الكاربابينيمز ، ESBL

Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique à l'échelon mondial, avec un impact défavorable sur la morbi-mortalité des patients (Cosgrove 2006). À l'heure de l'augmentation des résistances et de la consommation des antibiotiques dans le monde, la maîtrise et la compréhension des principaux mécanismes de résistances bactériennes paraissent aujourd'hui essentielles (Vallée et al. 2018).

Avec une incidence annuelle estimée de 4 à 6 millions de cas par an, les infections urinaires font partie du quotidien des médecins, en particulier les urologues. La voie urinaire est le deuxième site d'infection communautaire après les infections respiratoires. Les infections urinaires constituent une préoccupation constante en milieu urologique, du fait de leur fréquence très élevée, leur morbidité, l'allongement de la durée d'hospitalisation synonyme de surcoût, et à cause des bactéries multirésistantes incriminées dans ces infections. Elles nécessitent une prise en charge efficace et optimale, permettant de guérir le patient et de préserver l'écologie microbienne. (Vallée et al. 2018)

Au cours des dernières années, la fréquence et le spectre des infections urinaires résistantes aux antibiotiques ont augmenté tant à l'hôpital que dans la collectivité. Le développement et la fréquence croissante de la résistance aux médicaments ont été attribués à des combinaisons de caractéristiques microbiennes, aux changements sociaux et technologiques qui favorisent la transmission de la résistance mais surtout à la durée et la quantité de l'agent antimicrobien utilisé (Cabana et al. 1999)

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, particulièrement les entérobactéries, les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Acinetobacter* représentent actuellement un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Les infections nosocomiales causées par ces bactéries multi-résistantes ont non seulement conduit à une augmentation de la mortalité mais aussi du coût de traitement. (Diene et al. 2013). Face à cette préoccupation universelle, il est primordial de conduire des études d'épidémiologie moléculaire afin de comprendre et de contrôler la diffusion et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Cette surveillance demeure prioritaire pour les sociétés scientifiques et celles de santé publique afin de détecter les épidémies dans leur stade précoce surtout dans les pays en voie de développement, tels que l'Algérie.

L'acquisition de ces données dans ce pays est nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique des infections et pour élaborer une stratégie de contrôle de la résistance antimicrobienne surtout que la course mondiale engagée entre l'apparition de la résistance et la mise au point de nouvelles molécules est très inégale.

Afin de surmonter ces barrières, de nouvelles recommandations de bonne pratique concernant la définition, le diagnostic, l'évolution des résistances aux antibiotiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques des différentes infections de l'appareil urinaire ont été élaborées. L'objectif de ces données réactualisées est une prise en charge optimisée des patients ayant une infection du tractus urinaire dans le contexte de modification de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques

C'est dans cette optique que ce projet de Thèse de Doctorat s'inscrit avec comme objectifs :

- D'évaluer de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées du service de chirurgie urologique au CHU d'Annaba-Algérie.
- D'étudier les phénotypes de résistance aux antibiotiques des souches isolées ;
- Un intérêt particulier a été porté à la recherche de résistance des BGN vis-à-vis des carbapénèmes.
- D'identifier les supports génétiques de la résistance aux β -lactamines des BGN résistants aux carbapénèmes
- D'étudier la relation moléculaire et clonales des BGN résistants aux carbapénèmes ;

Ainsi ce manuscrit s'articule autour de quatre parties présentées comme suit :

- ❖ La première partie présentera une revue bibliographique sur les infections nosocomiales en urologie et les bactéries en cause ainsi que les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques des entérobactéries, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* et sur les données épidémiologique de leurs résistances.
- ❖ La deuxième partie, dans laquelle nous détaillerons les matériels et méthodes utilisées.
- ❖ La troisième partie, sera consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus.
- ❖ La quatrième partie on s'intéressera aux discussions qui en découlent ; et pour finir, une conclusion qui proposent quelques perspectives.

Chapitre I Généralités sur les infections nosocomiales en urologie

1. Rappel service d'urologie :

L'urologie est une discipline médicale et chirurgicale qui porte sur l'étude, le diagnostic et le traitement des affections touchant l'appareil urinaire, chez l'homme comme chez la femme. Elle concerne donc un vaste domaine de la médecine (MALI.2019)

2. Domaines d'activité

L'urologie est à la fois une spécialité chirurgicale (tous les urologues aujourd'hui sont des chirurgiens urologues ayant une formation chirurgicale complète) mais aussi médicale puisqu'elle prend en charge certains patients sans avoir recours à des interventions chirurgicales (hypertrophie bénigne de la prostate, calculs rénaux, infections testiculaires). La chirurgie urologique se consacre au diagnostic et au traitement des atteintes congénitales, infectieuses, lithiasiques, traumatiques et tumorales des appareils urinaires, masculins et féminins (rein, bassin, uretère, vessie, urètre) et de celles de l'appareil génital masculin (prostate, testicule, verge). L'étude et le traitement des troubles de la reproduction masculine, troubles de l'érection, de l'éjaculation, de la fertilité constituent l'andrologie qui est partie prenante de l'urologie avec d'autres spécialités (psychiatrie, endocrinologie, gynécologie). (MALI. 2019)

3. Rappel anatomique du système urinaire

L'appareil urinaire, qui fait partie du système excréteur, est l'appareil permettant l'évacuation des déchets du corps humain (produits du catabolisme cellulaire) sous une forme liquide : l'urine. Il assure ainsi l'épuration du sang et le maintien de l'homéostasie au sein de l'organisme. Il maintient aussi l'équilibre sanguin, soit le volume et la composition chimique du sang. Pour se faire, il élimine entre autres les surplus de certains minéraux, nommés électrolytes, et renvoie dans le sang les substances utiles au bon fonctionnement de l'organisme. Chaque jour, un être humain produit 800 à 2000 millilitres d'urine. L'appareil urinaire comprend (Figure 1) :

- Les reins, filtres du corps humain
- Les uretères, qui transportent l'urine des reins à la vessie
- La vessie, qui sert de stockage et de vidange de l'urine via l'urètre. Ce canal traverse la prostate, puis parcourt la verge pour s'ouvrir à l'extérieur du corps.(Genieys 2018)

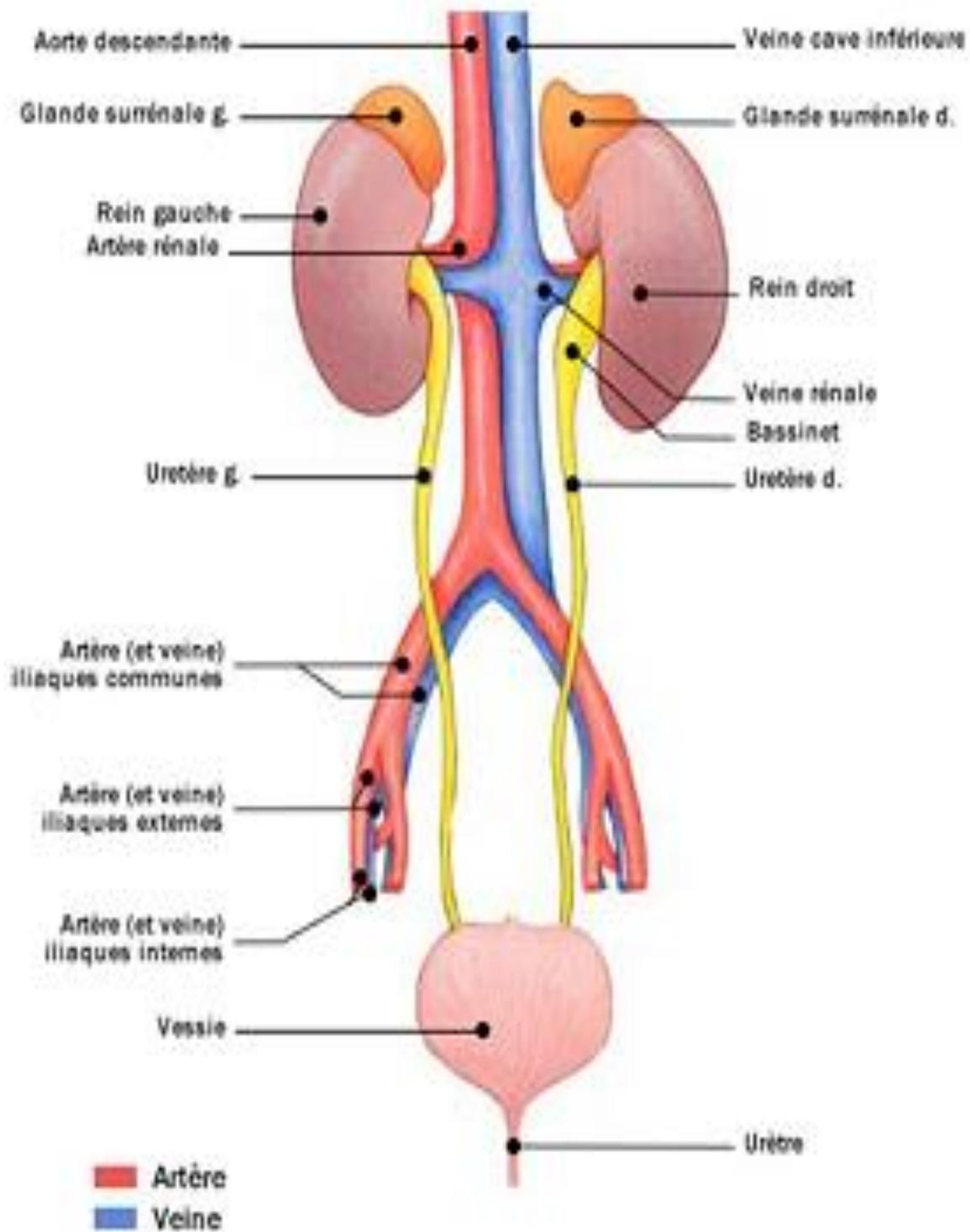


Figure 1: Anatomie de l'appareil urinaire (Genieys, 2018)

4. Définitions

4.1 Infection urinaire communautaire

L'infection urinaire est l'envahissement microbien de l'urine, asymptomatique ou symptomatique avec colonisation et inflammation des structures de l'arbre urinaire.

Les infections urinaires se manifestent par un ensemble de syndromes cliniques qui - suite à un prélèvement adéquat et adapté - ont en commun une culture positive et significative.

La définition bactériologique de l'infection urinaire est intimement liée à la concentration bactérienne trouvée dans l'urine qui est, avec l'identification de la ou des bactéries, le critère majeur et principal d'interprétation du résultat des cultures. Ce critère dépend aussi des données cliniques et du terrain. (EL ASSIMI 2021)

4.2 Infection urinaire nosocomiale

Une infection urinaire est dite nosocomiale lorsqu'elle est acquise dans une structure de soins (sans exclusive) ou d'une manière plus générale, reliée à la prise en charge du patient.

Si l'état à l'admission n'est pas connu, une infection apparaissant après un délai de 48 heures (H) à l'hôpital, est considérée comme infection nosocomiale en général. (Roberts 1991).

5. Réservoirs et sources

Le réservoir d'un agent infectieux est l'endroit où il maintient sa présence en se multipliant. Ce réservoir peut être humain, animal, environnemental ou mixte. La source est le lieu de contact entre l'agent infectieux et l'hôte. (Qassimi 2010)

Deux catégories d'infection sont à distinguer :

- **Les infections exogènes** : qui sont dues à des germes transmis au malade par les mains, la voie aérienne, la voie opératoire ou les cathéters.
- **Les infections endogènes** où le malade s'infecte avec ses propres bactéries modifiées ou non par une antibiothérapie (Bacilles multirésistants BMR).

C'est contre les infections exogènes que porte essentiellement la stratégie préventive visant à éviter la transmission des germes. (Qassimi 2010)

6. Les différents sites d'infection nosocomial

6.1 Les infections à distance du site opératoire

Sont essentiellement les infections urinaires dont nous traitons, mais il s'y associe les infections respiratoires, les infections sur cathéter et les infections hématogènes. On peut en rapprocher les infections cutanées (escarres). Elles ne sont pas influencées par l'antibioprophylaxie périopératoire. (J. V. Bennett *et al*, 2007)

6.2 Les infections du site opératoire :

Elles peuvent être superficielles au niveau de l'incision (présence de pus) ou profonde au niveau du siège de l'intervention. Depuis 1992 et sous l'influence des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, GA, États-Unis), toute infection sur le trajet de l'intervention, de l'incision à l'espace où siège l'organe opéré, est comptabilisée comme ISO. Ces infections sont influencées par l'antibioprophylaxie. (Lobel 2003)

7. Qui traiter ?

7.1 Sondes urinaires

Les sondes urinaires justifiées par l'intervention entraînent une infection des urines. Le risque d'acquisition d'une IUN lors du cathétérisme urinaire de courte durée est de 5 % par jour. Au-delà du 30^e j de sondage, plus de 90 % des patients présentent une bactériurie supérieure à 10⁵ UFC mL⁻¹. Ces infections peuvent être responsables dans 15 % des cas de bactériémies nosocomiales avec atteinte parenchymateuse (prostate ou rein). D'autres sondes que vésicales peuvent être mises en place au sein même de l'appareil urinaire comme les sondes urétérales (entre rein et vessie) ; ces sondes ont pour but le drainage des urines pour protéger une suture (vessie ou haut appareil urinaire), contrôler un obstacle urinaire (lithiase, sténose), évacuer un appareil urinaire incompetent ou contrôler une incontinence urinaire. Ces sondes ne doivent être laissées en place que le temps utile et bénéficier des règles élémentaires du sondage moderne : utilisation de systèmes clos et précaution d'hygiène dans les manipulations, notamment lors des prélèvements urinaires. Les sondes urinaires placées lors d'une intervention chirurgicale peuvent s'obstruer et devenir alors source de rétention d'urines infectées au niveau du haut appareil urinaire. Toute fièvre chez un patient en sonde urinaire est dans 70 % des cas d'origine urinaire. Un

patient porteur d'une sonde a 60 fois plus de risque de développer une bactériémie qu'un patient non sondé.

7.2 Chirurgie de la voie urinaire

L'ouverture pour raison chirurgicale de la voie urinaire peut être suivie d'infection de paroi ou d'infection profonde au niveau du siège opératoire. Les germes les plus fréquemment rencontrés sont les bacilles Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*) ainsi que les staphylocoques, les streptocoques et plus rarement les germes anaérobies

7.3 Chirurgie endoscopique

Notamment en urologie, la résection endoscopique de la prostate entraîne dans 20 à 25 % des cas selon l'enquête de l'Association française d'urologie menée en 1999 et celle de Colau, une bactériurie postopératoire malgré l'antibioprophylaxie et les mesures d'hygiène. Cette bactériurie mesurée à 10⁵ UFC mL⁻¹ accompagne des troubles mictionnels transitoires (pollakiurie, brûlures en urinant) mais jamais aucune complication septique grave n'a été relevée.

La question actuelle est de reconnaître dans ces IN la part revenant au patient lui-même et celle liée au non-respect des bonnes pratiques opératoires (maintien du système de drainage clos, manipulation des sondes et irrigation). (Lobel 2003) .

8. Les facteurs de risque des infections nosocomiales urologiques

Les facteurs favorisant les infections nosocomiales sont :

8.1 État général du patient

L'état général du patient est en relation directe avec le risque infectieux. Certains facteurs de risque sont bien connus : l'état nutritionnel (amaigrissement ou obésité), l'âge au moment de l'intervention. Dans l'étude menée en 2001 au CHU de Rennes en urologie, 23 % des patients ont plus de 70 ans et 6 % plus de 80 ans.

8.2 Les facteurs de risque liés à l'agent infectieux

-Virulence

-Résistance aux antibiotiques

8.3 Durée du séjour préopératoire

Elle est primordiale dans le risque d'apparition d'une infection postopératoire. L'hospitalisation entraîne une modification de la flore cutanée du patient. L'allongement du séjour préopératoire majore les complications de décubitus et s'associe souvent à des explorations invasives pour lesquelles les complications septiques sont réelles. (Grabe 2007)

9. Modes de transmission

En milieu hospitalier, la transmission par contact direct ou indirect est raisonnablement le mode de transmission prépondérant.

9.1 Transmission par contact direct

Dans ce mode de transmission, les mains du personnel soignant jouent un rôle important dans le transfert passif des micro-organismes d'un malade à l'autre.

9.2 Transmission par contact indirect

Ce mécanisme joue un rôle majeur dans la transmission des micro-organismes, dans lequel, les objets et les matériaux présents à l'hôpital peuvent servir de support de transmission, on distingue : -Les instruments de chirurgie. -Le matériel destiné au sondage, aux injections... - Les endoscopes, les stéthoscopes... Ces objets peuvent avoir été contaminés par le personnel ou par les malades (Qassimi 2010)

9.3 Les autres modes de transmission

- La transmission par voie aérienne peut affecter des patients particulièrement susceptibles (patients en salle d'opération, ou sévèrement immunodéprimés).
- La transmission par l'intermédiaire d'un support contaminé (nourriture, liquide de perfusion...) s'observe sporadiquement dans le cadre d'épidémies.
- La transmission par des vecteurs ne joue pratiquement pas de rôle à l'hôpital (Qassimi 2010)^

❖ Les infections urinaires dues aux bacilles à Gram négatif

L'infection urinaire représente 30,9% des infections nosocomiales (P. Astagneau E. Seringe 2010). Les simples colonisations urinaires (ou bactériurie asymptomatique) ne font pas partie des infections liées aux soins. La différenciation entre l'infection et la colonisation constitue un grand défi dans la pratique clinique. C'est un problème commun surtout chez les patients porteurs de cathéters. Dans notre travail la présence de symptômes clinique avec une preuve bactériologique (présence de germes pathogènes) ont permis de distinguer une infection d'une colonisation. Chez nos patients hospitalisés, Les infections les plus fréquemment causées par les BGN sont surtout urinaires (44% de toutes les infections), il est à noter que toutes les espèces bactériennes ont été diagnostiquées majoritairement dans les infections urinaires. Selon Podschun et Ullman (Podschun R, Ullmann U, 1998), la plupart des infections se produisent chez les patients hospitalisés, le système urinaire est le site le plus fréquent dans les infections nosocomiales et qu'elle était responsable de 6 à 17 % des infections urinaires nosocomiales. En Tunisie d'après le réseau LART *K. pneumoniae* est essentiellement isolée d'infections urinaires en milieu hospitalier (60,4%).(Ben Redjeb et Boutiba-Ben Boubaker I 2009) Dans une étude de prévalence marocaine portant sur les infections nosocomiales, les Klebsielles ont été isolées en deuxième position après *E coli* avec une fréquence de 22,2%. Dans les sites urinaires avec un pourcentage de 14,2% (Siah et al. 2009). Généralement, le principal facteur de risque d'infection urinaire nosocomiale est l'existence d'une sonde urétrale, qui augmente avec la durée du sondage, le risque infectieux existe aussi lors d'un simple sondage évacuateur. Chez nos patients hospitalisés le sondage urinaire a été mis en évidence dans 40,7% des cas. Notant que les infections urinaires liées au cathéter sont pauci symptomatiques. Par conséquent, la démonstration de la bactériurie était nécessaire pour faire le diagnostic. Une densité de 100.000 unités formant colonie par millilitre est généralement nécessaire pour diagnostiquer l'infection. La présence concomitante de pyurie est habituellement présente chez les patients présentant des infections associées aux cathéters, par opposition à ceux de la colonisation.

10. Les micro-organismes en cause des infections nosocomiales en urologie

-Dans cette partie de la bibliographie, on s'intéressera à l'étude des espèces suivantes :

K. pneumoniae, *E. coli*, *E. cloacae*, *M.morganii*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*, qui ont été les souches ciblées pendant notre échantillonnage.

Les bacilles à Gram négatif

Les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique aussi bien par la variété des espèces bactériennes qui les composent qu'à leur incidence au niveau de la santé des populations. Les familles des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires comptent actuellement plus de 100 espèces bactériennes. Mais dans les laboratoires ne sont isolées, avec une certaine fréquence, qu'une vingtaine d'espèces bactériennes qui peuvent présenter un intérêt médical, voir même être potentiellement pathogènes.

10.1 Enterobacteriaceae

10.1.1 Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante :

- Bacille à Gram négatif ;
- Immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche ;
- Aérobie anaérobies facultatifs ;
- se développant aisément sur milieu ordinaire ;
- fermentant le glucose
- ne possédant pas d'oxydase ;
- possédant une catalase

10.1.2 Habitat

Le nom d'entérobactéries a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux. Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif des entérobactéries pouvant proliférer en abondance dans l'environnement (sols et eaux) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques

10.1.3 Classification :

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres dont les principaux sont : *Escherichia*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES), *Proteus*, *Providencia*, *Morganella morganii*, *Salmonella**Shigella*(SS), *Yersinia* (ACHKOUR 2012).

10.1.4 Caractères bactériologiques :

a. Caractères morphologiques :

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique de type bacilles à Gram négatif de 2-3 μ de long sur 0,6 μ de large, généralement polymorphes. Les espèces mobiles les plus nombreuses le sont grâce à une ciliature péritriche. Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella*. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des *fimbriae* ou *pili* qui sont des facteurs d'adhésion.

b. Caractères cultureux :

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R).

- Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes.(BIOMERIEUX 2004)

- Dans le cadre de notre étude, les entérobactéries incriminées sont : *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, et *Morganella morganii*. Pour cela, il semble nécessaire de rappeler brièvement quelques caractéristiques générales de ces bactéries.

10.1.4.1 *Escherichia coli* :

Hôte normal de l'intestin et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence de colibacilles ou espèces voisines dans l'eau est un témoin de contamination fécale *Escherichia coli* exprime les caractères généraux des entérobactéries :

- Fermente le lactose, -production d'indole (milieu kligler),

-gazogène,

-souvent pas de production de H₂S, -uréase négative,

-pas d'utilisation de citrate et pas de formation d'acétoïne

Il existe différents pathotypes d'*Escherichia coli* responsables d'infections intestinales :

- **Enterotoxinogen** *Escherichia coli* (ETEC) : responsable de la « diarrhée des voyageurs » ou « turista » et des syndromes épidémiques dans les pays du Tiers monde.
 - **Enteroinvasive** *Escherichia coli* (EIEC) : encore appelé *Escherichia coli*, *Shigella-like*, responsable de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale ;
 - **Enterohaemorrhagic** *Escherichia coli* (EHEC) : responsable de diarrhées sanglantes liées à la production de toxines ;
 - **Enteropathogen** *Escherichia coli* (EPEC) : responsable de gastro-entérites infantiles.
- (BAKHOUM 2004) (Figure 2) .

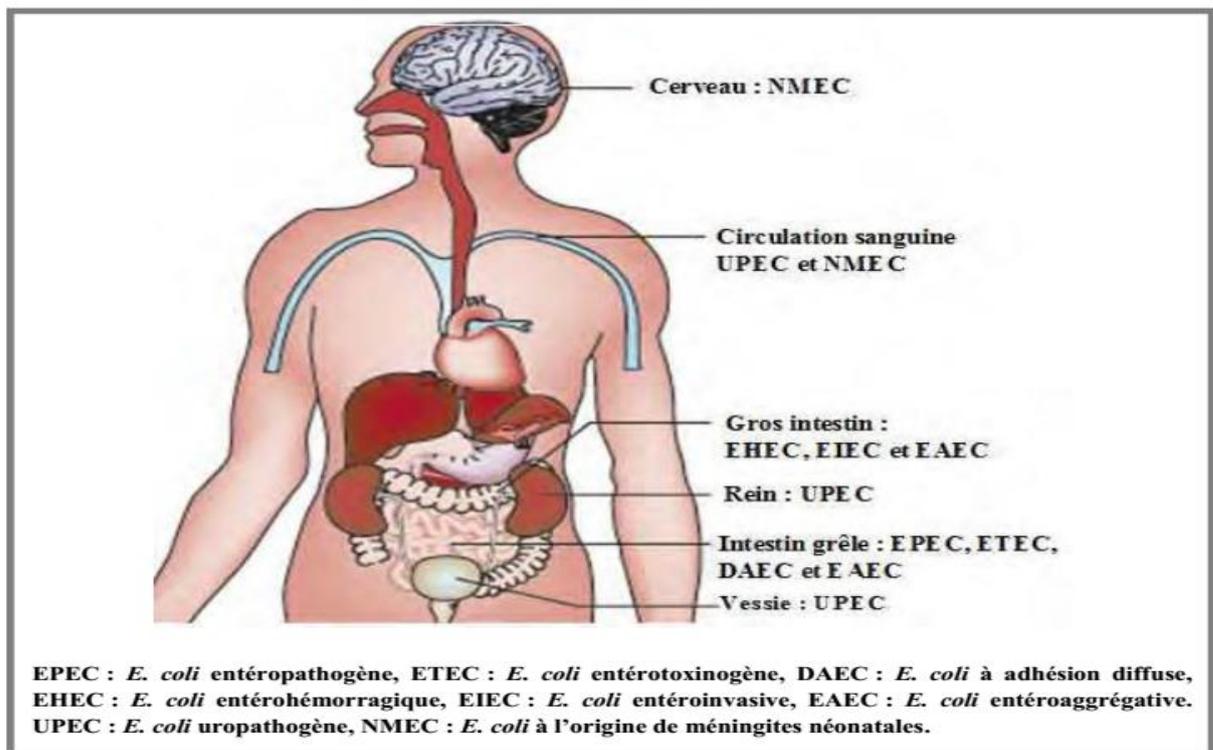


Figure 2: Sites de colonisation des *Escherichia coli* pathogènes (Croxen and Finlay, 2010)

10.1.4.2 Klebsiella

Au sein des entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles généralement encapsulés. On distingue cependant plusieurs espèces mais *Klebsiella pneumoniae* est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine.

- ***Klebsiella pneumoniae***

Connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander, *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie commensale de l'intestin, des voies respiratoires et des animaux.

Chez l'homme, elle est l'agent des pneumopathies aiguës, d'angines, d'otites, de cystites et d'affections rénales.

Ce sont des bactéries à Gram négatif immobiles capsulés, surtout au sortir de l'organisme, très polymorphes.

Sur gélose : les colonies de type mucoïde ont un aspect caractéristique ; elles sont volumineuses (4 mm de diamètre), bombées, brillantes, opaques et souvent confluentes.

En bouillon, on note la formation d'un trouble dense avec colorette visqueuse.

* *K. pneumoniae* est en général :

- Gazogène, -fermente le lactose, -possédant une catalase, -urée positive, -indole négative et, - VP positive (Réaction Voges-Proskauer) ou production d'acétoïne. (ACHKOUR 2012)

10.1.4.3 Enterobacter

Ce sont des entérobactéries VP positive (production d'acétoïne) comprenant plusieurs espèces :

- *Enterobacter cloacae* est l'espèce type

- *Enterobacter aerogenes*

- *Enterobacter gergoviae*

- *Enterobacter agglomerans*

- *Enterobacter sakazakii*

-Présents dans l'environnement, les *Enterobacter* sont également des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses. Ce sont des entérobactéries mobiles, capsulées ou non. Sur gélose, les colonies sont brillantes, opaques, souvent d'aspect assez gras. Les principaux caractères biochimiques sont :

- gaz en glucose, -urée négative et -indole négative. (BIOMERIEUX 2004)

10.1.4.4 *Morganella morganii*

Le genre *Morganella* se compose actuellement d'une seule espèce avec deux sous-espèces, *morganii* et *sibonii*. *Morganella morganii* est un organisme facultatif, anaérobique et ne fermente pas le lactose. Il se trouve normalement dans le sol, l'eau, les eaux usées, et il fait également partie de flore fécale de l'homme (Chou et al. 2009)

Ce bacille est reconnu comme étant un pathogène commun responsable d'infections opportunistes dans les voies respiratoires, urinaires et aussi les infections des plaies

Les *Morganella morganii* sont en général :

colonies grosses, lactose Catalase +, oxydase -, Réduction des nitrates en nitrites +, glucose +, ONPG -, LDC-, ODC +, indole +, VP -, H₂S-, TDA+, urée + (c'est une sous-espèce *morganii* qui a été envoyée), gélatinase. (Kim et al. 2007)

10.2 Les bacilles à Gram négatif non fermentaires :

10.2.1 Définition :

Ce sont des bactéries aérobies strictes qui sont caractérisées par un mode de production énergétique, ne faisant pas intervenir la fermentation. Elles sont ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (eaux, sols, air...)(Abir Ramoul et al. 2016). *P. aeruginosa* et *A. baumannii* sont des pathogènes opportunistes, souvent isolées dans les laboratoires de microbiologie médicale, notamment dans les unités de soins intensifs (Baba Ahmed-Kazi Tani et al. 2013).

10.2.2 Habitat :

Environ 15 % de tous les bacilles Gram négatif se développant en aérobiose, isolés dans les laboratoires de bactériologie médicale, sont des non fermentaires. Deux espèces : *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* représentent jusqu'à 75 % de ces isolements. Ces germes sont pour la plupart des pathogènes opportunistes dont l'habitat naturel est le milieu extérieur.

10.2.3 Classification :

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont à l'heure actuelle mieux classées grâce à de nombreuses études génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN. (Baba Ahmed-Kazi Tani et al. 2013)

10.2.4 Caractères bactériologiques :

a. Caractères morphologiques :

Les bacilles à Gram négatif non fermentaire se présentent sous forme de bacilles longs et fins à extrémité effilée (*Pseudomonas*) mais également sous forme de diplobacilles à

extrémité arrondie avec des formes coccoïdes et longues (*Acinetobacter*). Ils sont immobiles (*Acinetobacter*) ou mobiles.

b. Caractères culturels :

En général, les bacilles à Gram négatif non fermentaires croissent sur milieux simples comme la gélose Tryptone-Caséine Soja (TSA) et la gélose lactosée de Drigalski à 30°C et souvent à 37°C, avec un temps d'incubation de 48 à 72 heures pour que les colonies soient repiquables. (Carpentier et al. 2003).

10.2.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Communément appelé bacille pyocyanique (mot grec : bacille agent du pus bleu), c'est la principale espèce du genre *Pseudomonas* de par sa fréquence et sa présence dans de nombreuses niches écologiques (eaux, végétaux, sols). C'est un petit bacille fin, à Gram négatif, mobile grâce à une ciliature de type polaire monotriche en « vol de moucheron », oxydase positive. La culture de *P aeruginosa* sur gélose au sang TSA, est caractérisée par une odeur aromatique et la production de pigments (pyocyanine, pyoverdine). (Carpentier et al. 2003)

10.2.4.2 *Acinetobacter*

Les bactéries du genre *Acinetobacter* qui appartiennent à la famille des *Moraxellaceae* et *Acinetobacter baumannii* est l'espèce la plus fréquemment identifiée dans les infections humaines. Ce bacille à Gram négatif ubiquiste par excellence, dont l'Homme constitue un réservoir avec la peau comme support majoritaire est principalement identifié dans le sol et l'eau.

La morphologie particulière d'*Acinetobacter* permet, presque à coup sûr, d'orienter correctement leur identification.

L'examen au microscope optique de culture en milieux liquides peptonés simples, montre des diplobacilles à extrémités arrondies, toujours immobiles, isolés en courtes chaînettes, accompagnés de formes de cocci plus ou moins nombreux, plus rarement de formes allongées et massues dites « formes souffrantes » dont la formation serait favorisée par l'agitation des cultures. *Acinetobacter* croissent bien sur les milieux de culture de routine avec une température optimale de 33 à 35°C, seule *Acinetobacter baumannii* à croître à 44°C.

Sur gélose de Drigalski, les colonies d'*Acinetobacter* ne fermentent pas le lactose, elles sont lisses, à bordure nette. Sur TSA, les colonies présentent le même aspect, avec une réaction d'oxydase négative et une réaction de catalase positive.

A. baumannii est un pathogène opportuniste qui peut être responsable d'infections sévères malgré sa faible virulence, en particulier chez les patients immunodéprimés.(Bergogne-Bérézin 2007; L. Poirel et Nordmann 2006)

Chapitre II Rappel sur les antibiotiques et leurs mécanismes de résistances

1. Définition de l'antibiotique

Le mot antibiotique (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») est utilisé pour définir une substance d'origine naturelle ou synthétique, utilisée contre les infections d'origine bactérienne. On peut ajouter à cette définition générale que l'antibiotique possède la capacité de tuer les bactéries (effet bactéricide) ou d'inhiber leur multiplication (effet bactériostatique). Certains antibiotiques peuvent, en fonction de leur concentration, être bactéricides ou bactériostatiques. D'un point de vue médical, il est nécessaire que l'antibiotique exerce sa toxicité de façon élective envers les bactéries, au moins aux doses employées afin ne pas provoquer de trop nombreux effets indésirables. Globalement, en moins d'un siècle, les antibiotiques ont augmenté l'espérance de vie de plus de dix ans, soit plus qu'aucun autre médicament. (Legrand 2017)

2. Principales classes et familles d'antibiotiques et leurs modes d'action

On distingue cinq classes principales d'antibiotiques pour certaines divisées en sousclasses :

- Les bêta-lactamines comprenant les pénicillines des groupes G/V, M, A, les carboxypénicillines, les uréidopénicillines et les amidinopénicillines, les carbapénèmes, un monobactam et les céphalosporines
- Les aminosides
- Les macrolides
- Les quinolones et fluoroquinolones
- Les cyclines En dehors de ces cinq classes

On retrouve aussi les glycopeptides ou lipoglycopeptides (vancomycine, teicoplanine, dalbavancine), la fosfomycine, un lipopeptide (daptomycine), les polymyxines, les phénicol, l'acide fusidique, les sulfamides et triméthoprine.

2.1 Les bêta-lactamines

Dans cette famille on retrouve des sous-familles elles-mêmes subdivisées pour certaines en sous-groupe. Toutes les molécules de cette famille possèdent un noyau bêta-lactame (en rouge sur la figure 3) qui est la partie efficace de la molécule. Des variations au niveau de la chaîne latérale naturelle ou greffée permettent de modifier les propriétés de la molécule antibiotique.

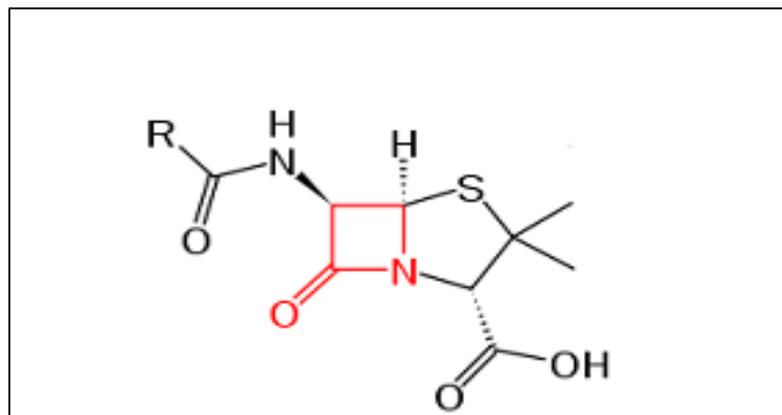


Figure 3: Squelette d'une bêta lactamine (culturescience.chimie.fr, La pénicilline, 2019)

- Le groupe principal et le plus ancien est celui des pénicillines qui comprend le groupe des pénicillines G et V et les formes retard (benzathine benzylpénicilline), les pénicillines du groupe A (amoxicilline), celles du groupe M (cloxacilline, oxacilline), les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), les aminidopénicillines (pivmécillinam), la témocilline (dérivé de la ticarcilline).

-Le second sous-groupe principal derrière les pénicillines, est celui des céphalosporines avec les céphalosporines de 1 ère génération ou C1G (céfalexine, céfalotine, céfazoline...), les céphalosporines de 2ème génération ou C2G (céfuroximes, céfoxitine...), les céphalosporines de 3ème génération ou C3G (céfépime, céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone).

-Dans les bêta-lactamines on a ensuite les carbapénèmes avec l'ertapénem, l'imipénem et le méropénem ainsi qu'un monobactam, l'aztréonam.

-Certains inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) possèdent également un noyau bêta-lactame. Ces inhibiteurs sont toujours utilisés en association.

- **Mode d'action :**

Ils ont un mode d'action identique en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane .Principal constituant de la paroi bactérienne. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. Ces enzymes, collectivement appelées PLP « protéines liant les pénicillines », sont insérées

dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne. Pour être actives, les b-lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP (Philippon, 2013).

2.2 Les aminosides

Dans cette famille, on distingue des sous-groupes en fonction de la substitution sur l'aminocyclitol (génine). L'amikacine et la tobramycine (dérivés de la kanamycine), ainsi que la gentamicine et ses dérivés (nétilmicine) appartiennent au sous-groupe des désoxystreptamines.. La streptomycine est un dérivé non substitué de la streptomine.

Cette famille d'antibiotique n'est jamais utilisée seule en thérapeutique mais toujours associée à au moins une autre famille d'antibiotiques (bêta-lactamines par exemple), sauf en cas d'infection urinaire.

Le traitement par aminoside ne doit pas excéder 7 jours et la dose journalière doit être unique

- **Mode d'action :**

Le mécanisme d'action des aminoglycosides se fait par la liaison au site A de l'ARN 16S .constituant de la sous unité 30S principalement et, accessoirement, de la sous unité. (Wax et al. 2007)

2.3 Les quinolones et fluoroquinolones

Les quinolones sont des agents antibactériens de synthèse. Il est usuel de les séparer en : Quinolones de 1ère génération (restreintes à des indications urinaires) ; Fluoroquinolones (ou quinolones de 2ème génération), dont l'élargissement du spectre antibactérien et les caractéristiques pharmacocinétiques autorisent leur utilisation dans de nombreuses infections systémiques ; Fluoroquinolones antipneumococciques. (Ellatifi 2011) Les fluoroquinolones dérivent des quinolones, d'où l'appellation. Ce sont des antibiotiques de synthèse, qui possèdent toutes un atome de fluor (Figure 4).(Cazes 2017)

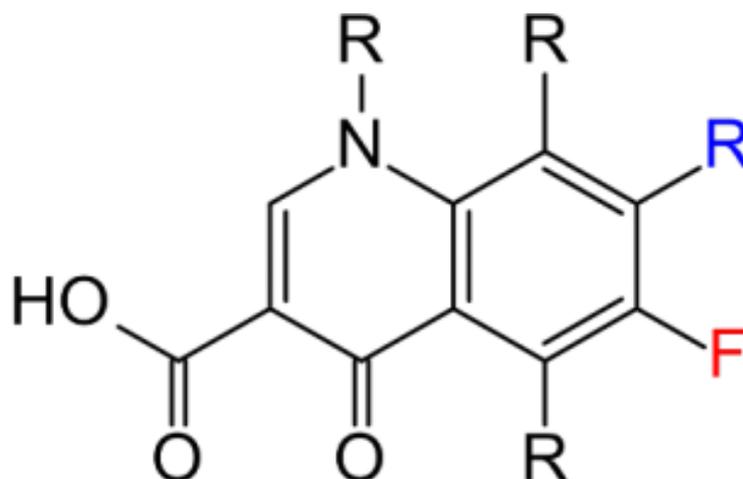


Figure 4: Structure de base des quinolones

- **Mode d'action :**

Les quinolones inhibent l'action des topoisomérases de type II. Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" .et de la topoisomérase IV. Ces enzymes sont essentielles à la croissance bactérienne en contrôlant la topologie de l'ADN lors des étapes de réplication, de transcription, et de recombinaison/réparation de l'ADN. Ces enzymes tétramériques, homologues entre elles, sont constituées de deux sous unités GyrA et GyrB (ADN gyrase) ou ParC et ParE (topoisomérase IV). À noter que l'ADN gyrase est généralement la cible préférentielle chez les bactéries à Gram négatif tandis que la topoisomérase IV l'est chez les bactéries à Gram positif. (Cattoir 2012)

2.4 Les cyclines

Ou tétracyclines sont appelées ainsi à cause de leurs quatre cycles accolés. Dans cette famille on retrouve la doxycycline, lymécycline, minocycline et tigécycline (Figure 5) .(Buxeraud et Faure 2016) .

- **Mode d'action :**

C'est avec les tétracyclines qu'est apparu le terme "à très large spectre". Qui agissent également en empêchant la synthèse de protéine. En se fixant sur la sous-unité 30 S du ribosome bactérien.et perturbe l'interaction de codon-anticodon aminoacyl-ARNt et l'ARN messagère, empêchant de ce fait l'attachement de l' aminoacyl-ARNt sur le ribosome..(Wax et al. 2007; Yala et al. 2001)

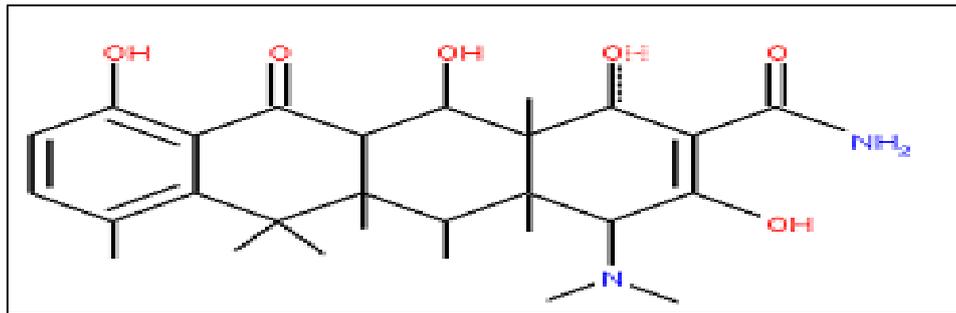


Figure 5: Structure de base des cyclines (Sciencedirect.com, cycline antibiotiques, 2019)

2.5 Les phenicoles :

Représentée par le chloramphénicol et le thiamphénicol. Les deux molécules sont bactériostatiques. Le chloramphénicol reste toujours un agent bactériostatique important. Ce sont des antibiotiques à large spectre. Actuellement, en France, leurs indications cliniques sont limitées du fait de la toxicité médullaire potentielle du chloramphénicol. (Yala et al. 2001)

- **Mode d'action :**

Sont des petites molécules hydrophobes, traversent facilement la membrane externe et interne des bactéries à Gram négatif. Ils agissent en se fixant sur la sous unité 50 S du ribosome, qui empêche la fixation des ARNt inhibant ainsi l'élongation des chaînes polypeptidiques. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines. (Wax et al. 2007)

2.6 l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime:

L'association "sulfamide triméthoprime" la plus utilisée est le cotrimoxazol Bactrim® . Ces deux produits interviennent dans la même chaîne métabolique . Bloquent la synthèse des folates à deux stades différents, ce qui renforce leur activité antibactérienne. (Lesage et al. 1974).

2.7 Les Sulfamides:

Ils ont une activité bactériostatique. Les sulfonamides, sont des agents antibactériens les plus anciens et totalement synthétiques.

- **Mode d'action :**

Sont des inhibiteurs compétitifs de la Dihydréosynthétase. Ils entrent en compétition avec l'Acide para-amino benzoïque bloquant ainsi l'action de la synthétase. Ce qui entraîne l'épuisement de l'Acide Dihydrofolique. (Wax et al. 2007; Yala et al. 2001)

3. Les mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques

3.1 La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques est un problème d'importance croissante en pratique médicale. Au fur et à mesure de la découverte de nouveaux antibiotiques, les bactéries ont progressivement accumulé dans leur matériel génétique les gènes conduisant à la multi-résistance. Trois familles d'antibiotiques (Bêta-lactamines, Aminosides, Quinolones) peuvent être utilisées contre les entérobactéries multirésistantes.

3.1.1 La résistance aux β -lactamines

La résistance des entérobactéries aux betalactamines set soit naturelle, soit acquise Phénotype sauvage ou résistance naturelle

3.1.1.1 Résistance naturelle

Les entérobactéries sont classées en 7 groupes en fonction de leur sensibilité naturelle aux Blactamines.(François et al. 2004). La classification a évolué à partir de l'approche phénotypique de l'antibiogramme. Elle a permis de revoir les groupes pour inclure les nouvelles espèces et a été adaptée en fonction des caractéristiques génomiques des β - lactamases et des résistances identifiées.

Groupe 0 : inclut les entérobactéries ne possédant aucun gène codant pour une β -lactamase.

Groupe 1 : (céphalosporinase constitutive de très bas niveau) : résistance naturelle pour une céphalosporinase de la classe C d'Ambler donc résistante aux inhibiteurs. (Robin, Gibold, et Bonnet 2012).

Groupe 2 : (pénicillinase de bas niveau) : inclut les espèces possédant une pénicillinase chromosomique constitutive exprimée à bas niveau .Le phénotype de résistance est caractérisé par une résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines.

Groupe 3 : (céphalosporinase inductible) : comprend les espèces des entérobactéries productrices de céphalosporinase AmpC, résistante aux inhibiteurs et inductible par les β -lactamines car régulées par un facteur de transcription AmpR. Le phénotype de résistance est marqué par une résistance aux aminopénicillines seules ou associées aux inhibiteurs et une résistance aux C1G.(A. Philippon et Arlet 2012).

Groupe 4 : (céphalosporinase inductible + enzyme sensible aux inhibiteurs) : production de deux enzymes : une céphalosporinase inductible de classe C donc résistante aux inhibiteurs et une enzyme sensible aux inhibiteurs.

Groupe 5 : (céfuroximase inductible) : rassemble les espèces produisant une enzyme

chromosomique, sensible aux inhibiteurs, inductible et ayant un spectre d'activité hydrolytique proche de celui des BLSE. Ils présentent naturellement une résistance aux aminopénicillines, aux C1G et au céfuroxime, ainsi qu'une sensibilité aux associations d'aminopénicillines et d'inhibiteurs (A. Philippon et Arlet 2012).

Groupe 6 : (BLSE de bas niveau/ BLSE inductible) : possèdent une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et au céfuroxime. Elles sont sensibles aux associations de pénicillines-inhibiteurs des β -lactamases. Elles restent habituellement sensibles aux uréidopénicillines et aux C3G.(Robin, Gibold, et Bonnet 2012).

3.1.1.2 Résistance acquise ou phénotypes « résistants »:

Les entérobactéries peuvent développer plusieurs mécanismes de résistance aux bêtalactamines

- Modification de la cible PLP
- Inactivation enzymatique par production de B-lactamase
- Résistance par efflux actif : des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration ;
- Résistance par imperméabilité : une altération qualitative ou quantitative (Figure 6) ,(Patrice Nordmann 2014) (Figure 7).

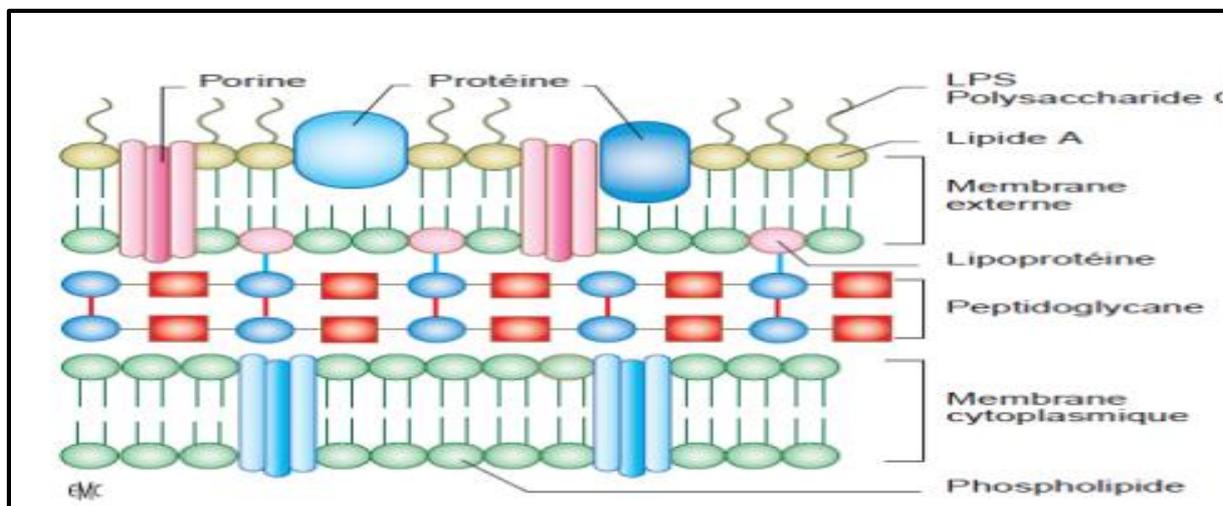


Figure 6: Structure schématique de la paroi bactérienne et de la membrane Cytoplasmique (Cavallo et al., 2004)

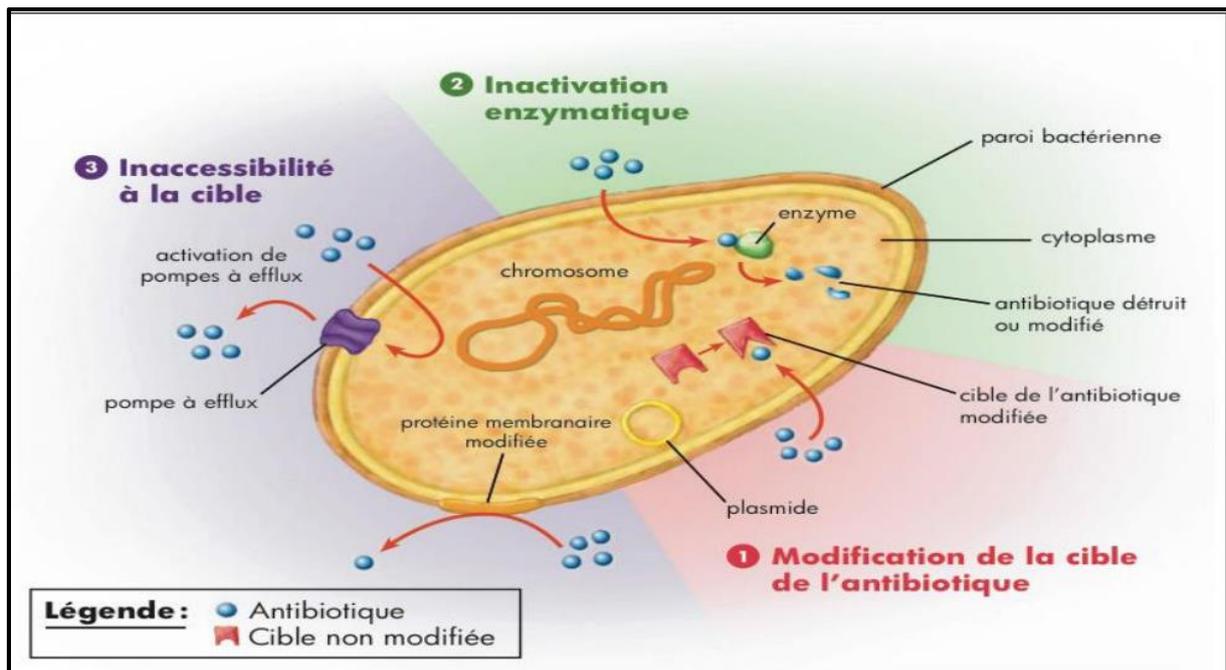


Figure 7: Les mécanismes de résistances aux ATBs

i. Imperméabilité

La résistance acquise par imperméabilité est aussi décrite en liaison avec le dysfonctionnement d'une porine. Ce mécanisme de résistance a été par le passé difficile à distinguer de celui qui fut découvert plus tardivement et appelé efflux. (Rossolini, D'andrea, et Mugnaioli 2008). Cependant des résistances acquises par diminution de la perméabilité de paroi ont été rapportées chez *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*, et d'autres BGN suite à une altération quantitative ou qualitative des porines. (Alain Philippon 2008).

ii. Mécanisme de transport de type efflux actif

La résistance par systèmes d'efflux, de découverte plus récente, apparaît être le principal mécanisme chez les bactéries à Gram négatif et divers gènes codent pour des protéines membranaires permettant l'efflux de l'antibiotique hors de la cellule et donc empêchant son accumulation intracellulaire. Ces protéines, de l'ordre de 40-46 kDa, montrent des homologies structurales entre elles ainsi qu'avec d'autres protéines d'efflux comme celles des systèmes *multidrug resistance* (MDR) : Les gènes chromosomiques codant des protéines membranaires de transport peuvent être responsables de la résistance à divers antibiotiques.

iii. Modification d'affinité de la cible

La modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles affecte plus les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif. Ce mécanisme reste très rare chez les entérobactéries (Cantón et al. 2008; Alain Philippon 2008).

iv. Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

A. Les bêtalactamases :

- Les bêtalactamases sont des enzymes d'inactivation de type sérine (classes A, C et D) ou métallo enzymes (classe B) dont les substrats sont des bêtalactamines.
- La production de bêtalactamase est un mécanisme que l'on retrouve aussi bien chez les bactéries à Gram positif que Gram négatif, il s'agit du mode de résistance le plus courant. Le support génétique qui code pour ces enzymes est soit d'origine plasmidique soit chromosomique.
- L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle bêtalactame (structure de base des bêtalactamines). Ainsi l'hydrolyse du cycle bêtalactame empêche les bêtalactamines de se fixer de façon covalente sur le site actif des enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi, les protéines liant les pénicillines (PLP).
- Plusieurs centaines de bêtalactamases ont été identifiées chez diverses espèces bactériennes. Ces enzymes peuvent être classées en fonction de leur spectre d'activité (β - lactamases à spectre étendu (BLSE), céphalosporines, carbapénèmes), ou leur séquence en acides aminés, c'est la classification d'Ambler, qui est la plus utilisée en pratique.

❖ β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE sont des enzymes de classe A plasmidiques, qui présentent un potentiel de diffusion et une prévalence justifiant une surveillance épidémiologique. Elles confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération et à au moins une céphalosporine de 3^{ème} ou 4^{ème} génération ou à l'aztréonam. La sensibilité aux associations pénicillines-inhibiteurs de β -lactamases est souvent conservée. Cependant, le phénotype de résistance varie avec la nature de la BLSE produite et selon son niveau de production. L'association pipéracilline-tazobactam est l'association pénicilline-inhibiteur la plus souvent active. La mise en évidence des BLSE repose sur la détection d'une synergie entre au moins une C3G/C4G ou l'aztréonam et le clavulanate. Cette détection peut être difficile chez les espèces du genre *Proteus* du fait d'une moindre production de ces enzymes.

Différents types de BLSE sont classées selon leurs types moléculaires, les plus fréquents étant les types TEM, SHV, CTX-M (Jacoby et Munoz-Price 2005; Robin, Gibold, et Bonnet 2012).

➤ **TEM (Tem oneira - nom du patient)**

Les BLSE de type TEM dérivait de TEM-1, qui a été détecté pour la première fois sur une souche de *E. coli* isolée chez un patient à Athènes en Grèce en 1965 et de TEM-2. Elles comptent actuellement plus de 150 dérivés dont plus de 100 avec un phénotype BLSE. (Bradford 2001; Munoz-Price et al. 2013). En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes chez les entérobactéries sont TEM-24, TEM-3 et TEM-4 et TEM-52 (Cantón et al. 2008). En Algérie, TEM-1 est le type le plus répondeur (Belbel et al. 2014; Lagha, Abdelouahid, et Hassaine 2015; Abir Ramoul et al. 2016) et rarement TEM-4, TEM-48 et TEM-188 (Kermas et al. 2012; Lagha, Abdelouahid, et Hassaine 2015).

➤ **SHV (Sulphydryl variable)**

Tout comme les enzymes de type TEM, la majorité des enzymes SHV identifiées actuellement sont des BLSEs et dérivent toutes de SHV-1 et de SHV-2. La majorité des dérivés de SHV-1, plus de 60 dérivés, ont un phénotype BLSE, avec SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe (Cantón et al. 2008). La résistance induite par SHV-1 est limitée aux pénicillines. Par contre, SHV-2, qui a été décrite pour la première fois en 1983 chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne, est capable d'hydrolyser le cefotaxime (V. Gupta, Datta, et Chander 2007)

En Algérie, les BLSE de type SHV les plus fréquents sont SHV-12, SHV-11, SHV-1, SHV-32 et SHV-133. Les moins répondeurs sont SHV-1a, SHV-2a, SHV-28, SHV-31, SHV-33, SHV-98, SHV-99 et SHV-100. (Berrazeg et al. 2013; Iabadene et al. 2008; Labid et al. 2014; Lagha, Abdelouahid, et Hassaine 2015; Ramdani-Bougoussa et al. 2006; Abir Ramoul et al. 2016)

➤ **CTX-M (Céfotaximase -Munich)**

Ces enzymes représentent actuellement les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (Livermore et al. 2007).

Un certain nombre de variantes CTX-M sont capables d'hydrolyser la ceftazidime à un plus haut niveau (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27) (Réjiba et al. 2011).

En Algérie, plusieurs études rapportent non seulement la diffusion de CTX-M-15, mais également de CTX-M-3 et CTX-M-28.(Baba Ahmed-Kazi Tani et al. 2013; Belbel et al. 2014; Gharout-Sait et al. 2012; Iabadene et al. 2008; Meradi et al. 2009; Messai et al. 2008; Naas et al. 2011; Nedjai et al. 2012; Ramdani-Bougoussa et al. 2011; 2006; A. Touati et al. 2007; 2006)

❖ Céphalosporinase de haut niveau

Le phénotype de résistance céphalosporinase de haut niveau se traduit par une résistance à l'ensemble des β -lactamines excepté les carbapénèmes (Eyquem, Alouf, et Montagnier 2000). Il peut subsister une activité des céphalosporines à large spectre (céfépime, cefpirome). Il s'agit d'un phénotype retrouvé principalement chez les bactéries possédant naturellement une céphalosporinase ampC qui peut être alors surexprimée (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii* et autres entérobactéries du même groupe)(Gueudet et al., 2010) . Depuis 1990, des céphalosporinases codées par des gènes plasmidiques ont été décrites. Parmi celles-ci, il y a MIR-1, BIL-1 et CMY-2(Seck 2005).

Cette résistance a été retrouvée chez *Klebsiella pneumoniae* mais également chez d'autres entérobactéries. Ces enzymes à médiation plasmidique dérivent des céphalosporinases chromosomiques d'*Enterobacter* (ACT-1 et MIR-1), de *Citrobacter* (CMY), de *Morganella* (DHA), d'*Hafnia* (ACC-1) et d'autres entérobactéries (MOX, FOX)(A. Philippon et Arlet 2006). En Algérie, CMY-2, CMY-4 like, CMY-12 et DHA-1, sont les plus répondu (Baba Ahmed-Kazi Tani et al. 2013; Robin et al. 2010).

❖ Résistance par production des carbapénemases :

Ces dernières années, les carbapénèmes sont devenues les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices de BLSE. Cette résistance est principalement due à deux mécanismes impliquant des β -lactamases(P. Nordmann et Carrer 2010). Le premier associe la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE à une diminution de perméabilité membranaire par perte ou altération de porines et se traduit par une diminution de l'activité de nombreuses β -lactamines y compris l'imipénème(Mainardi et al. 1997). Le second mécanisme met en jeu des β -lactamases capables d'hydrolyser fortement les carbapénèmes, nommées carbapénémases(Patrice Nordmann, Naas, et Poirel 2011).

Les carbapénémases sont des β -lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. D'après la classification d'Ambler, les β -lactamases sont réparties en 4 classes

en fonction de leur structure primaire. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active (type sérine) tandis que la classe B regroupe les métallo- β -lactamases (métalloenzymes) nécessitant la présence d'un ion Zn^{2+} au niveau de leur site actif. (P. Nordmann et Carrer 2010) Une autre classification existe, la classification fonctionnelle de Bush, mais est peu utilisée dans le monde médical, en raison de sa complexité.

➤ **Classe A :**

-Les carbapénèmases de classe A ont été tout d'abord rapportées dans plusieurs souches des entérobactéries isolées de l'environnement (*Serratia*, *Enterobacter*), produisant des bêtalactamases dont l'activité était inhibée par l'acide clavulanique. Elles hydrolysaient, à divers degrés, toutes les bêtalactamines.

-Chez les entérobactéries, une variété de carbapénémase de classe A a été décrite: certaines sont chromosomiques (AMNC, Sme, IMI-1, SFC-1) et d'autres sont plasmidiques (KPC, IMI-2, GES et leurs dérivés tels que GES-1, Ges- 2, GES-4, et GES-5 ont été identifiées chez *K. pneumoniae* et *E. coli*) (Queenan et Bush 2007). Il s'agit de carbapénémase de structure très similaire à la BLSE c'est le GES-1, dont elles ne diffèrent que par de simples changements ponctuels d'acides aminés qui expliquent l'élargissement de leur spectre de substrat. (Patrice Nordmann, Boulanger, et Poirel 2012).

-Les carbapénèmases de classe A, les plus fréquentes et les plus menaçantes, sont les carbapénèmases de type KPC (KPC-2 à KPC-8). Leur activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam (Vaux et al. 2011), Treize variantes de KPC sont connues à ce jour; KPC-2 et KPC-3 sont les variantes les plus fréquents dans le monde entier, (Pfeifer, Cullik, et Witte 2010). Le plus souvent les souches qui produisent KPC expriment également d'autres bêta-lactamases dont de nombreux types de BLSE et possèdent un certain degré de résistance par imperméabilité. Les souches KPC apparaissent donc le plus souvent multi résistantes aux bêta-lactamines, l'ertapénème étant le carbapénème dont le niveau de résistance est le plus élevé (Vaux et al. 2011). Les producteurs du KPC sont répandus dans le monde entier et deviennent un problème majeur de santé publique et clinique (Patrice Nordmann, Cuzon, et Naas 2009).

➤ **Classe B**

Les premières carbapénèmases de classe B (IMP :Imipénémase) (ou métallobêta- lactamases, MBL) avaient été identifiées dans des espèces des entérobactéries typiquement hospitalières (*Serratia*, *Citrobacter* et *Enterobacter*) au Japon(Queenan et Bush 2007; Walsh 2008). Puis d'autres MBL ont été isolées dans des entérobactéries, dans le monde entier ; il s'agit des nombreuses variétés de bêta-lactamases de type IMP et VIM(Verona Integron encoded Metallo-bêta-lactamase), GIM-1, KHM-1 et NDM-1(New Delhi metallo-bêta-lactamase 1) (Walsh 2008; Yong et al. 2009). Ces enzymes hydrolysent très fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité *in vitro* n'est pas affectée par les inhibiteurs suicides de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam). Ce sont des métallo-enzymes qui contiennent un ion zinc dans leur site actif expliquant l'inhibition de leur activité par l'EDTA (chélateur des cations divalents) ou l'acide dipicolinique.

➤ **Classe D**

La carbapénémase de classe D, également nommée OXAs pour oxacillines comprenant 232 enzymes (OXA-48, OXA-163, OXA-181 ...) avec quelques variantes possédant la même activité de carbapénémase (Patrice Nordmann, Boulanger, et Poirel 2012). Initialement OXA a été signalée par *P. aeruginosa*, mais jusqu'à présent, ces carbapénèmases ont été détectées dans les bactéries Gram négatif, y compris les entérobactéries. (Pfeifer, Cullik, et Witte 2010) . La carbapénémase de classe D, OXA-48 décrite tout d'abord chez *K. pneumoniae*(Laurent Poirel et al. 2004), par la suite les souches productrices d'OXA-48 ont été largement rapportées en tant que sources d'épidémies nosocomiales dans de nombreuses régions du monde notamment dans les pays méditerranéens (Benouda et al. 2010; Carrère et al. 2010) : Croatie, Égypte, France, Grèce, Israël, Italie, Liban, Libye, Slovaquie, Espagne, Tunisie et Turquie, Maroc(Djahmi et al. 2014). Cette carbapénémase hydrolyse par contre, beaucoup plus fortement les carbapénèmes et n'hydrolyse pas les céphalosporines de 3e génération. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique(Laurent Poirel et al. 2004) . OXA-48 est souvent associée à d'autres bêta-lactamases en particulier des BLSEs , ce qui contribue à la multirésistance des souches(Carrère et al. 2010; Gülmez et al. 2008). En l'absence d'autres bêta-lactamases, les souches qui ne produisent que OXA-48 peuvent ne présenter qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes (Aktaş et al. 2008) . Le gène d'OXA-48 est localisé au sein d'un

transposon comportant deux séquences d'insertion identiques assurant mobilité et expression (Laurent Poirel et al. 2004). Plus récemment, des souches produisant une oxacillinase similaire, OXA-181, ont été isolées en Inde ou chez des patients d'origine indienne (Castanheira et al. 2011).

B. Inactivation enzymatique des aminosides :

L'inactivation enzymatique des Aminosides est le mécanisme de résistance le plus souvent observé, Il permet d'expliquer la résistance de plus de 95% des souches d'Entérobactéries résistantes aux aminosides, de 95% des souches d'*Acinetobacter* spp, de 50% des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de 95% des souches de bactéries à Gram positif (Fleming, Goldner, et Glass 1963; Jana et Deb 2006).

Les Aminosides peuvent ainsi perdre leur capacité à se fixer sur leur cible : le ribosome, lorsque certaines de leurs fonctions sont modifiées par des enzymes bactériennes spécifiques. Certaines de ces enzymes sont acquises par les bactéries pathogènes à l'occasion des échanges génétiques avec des espèces environnementales. D'autres, en revanche, ont une origine intrinsèque (Chevalier et al. 2008; Guillard et Cambau 2012; Robicsek et al. 2006)

C. Inactivation enzymatique des phénicolés

Pour le chloramphénicol et le thiamphénicol, l'inactivation enzymatique est le mécanisme de résistance le plus fréquent. Elle agit par acétylation par une chloramphénicol acétyltransférase du groupement hydroxyle de la molécule. On a identifié 3 enzymes chez les bactéries à Gram négatif et cinq chez les bactéries à Gram positif. A l'exception de *Streptococcus pneumoniae*, ces enzymes sont codées par des plasmides. Les chloramphénicol acétyltransférases sont cependant inactifs sur le florfénicol. (AZMOUN 2016).

4. La résistance aux antibiotiques chez les BGNs non fermentaires

4.1 *Pseudomonas aeruginosae*

4.1.1 Résistance naturelle

Pseudomonas est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération, et d'une mauvaise perméabilité membranaire (Cholley 2010). Pour la famille des bêta-lactamines, les molécules qui restent actives sont la ticarcilline, la pipéracilline, la cefsulodine, l'association ticarcilline + clavulanate, la ceftazidime, l'aztréonam et l'imipénème. *P. aeruginosa* est également généralement résistant à la kanamycine. (Laurent 2006)

4.1.2 Résistance acquise

4.1.2.1 Résistance aux bêta-lactamine

i) Résistance enzymatique

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type sérine (classes A, C et D) ou métalloenzymes (classe B) dont les substrats sont des β -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle β -lactame (A. Philippon et Arlet 2005).

✓ **Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C**

La β -lactamase chromosomique de type AmpC a été décrite chez une large variété de bacilles à Gram négatifs tel que *P. aeruginosa* (Mohamudha, Harish, et Parija 2010). Des mutations dans le système de régulation de la production entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC affectant l'activité de l'ensemble des β -lactamines à l'exception de celle des (Laurent 2006).

✓ **Oxacillinase de classe D**

Chez *P. aeruginosa* des BLSE dérivées d'OXA-10 et OXA-2 ont été isolées ainsi que la β -lactamase OXA-18. Ces enzymes sont localisées sur des plasmides (sauf OXA-18). Ils hydrolysent la plus part des β -lactamines y compris les céphalosporines, l'imipénème et le méropénème. L'aztréonam et la pipéracilline sont moins touchés, mais leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam.

L'OXA-18 est la seule β -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifiée chez *P. aeruginosa*. (Pechère et Köhler 2008).

✓ Carbapénèmases de classe B

La résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème), initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine, peut être maintenant en relation avec la synthèse de β -lactamases de type carbapénémase (classe B). Ce sont des métallo-enzymes qui sont dépendantes de la présence d'ions Zn^{++} , donc inhibables par des chélateurs d'ions tel l'EDTA (A. Philippon et Arlet 2006).

✓ β -lactamase à spectre étendu ou élargi

Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) sont des enzymes récemment apparues à la suite de mutations des pénicillinases. Elles sont plasmidiques donc transférables et sensibles à l'action des inhibiteurs enzymatiques (Emmanuel 2004). Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération, elles touchent également les céphalosporines de troisième génération (céftazidime et céfotaxime) et les monobactames (aztréonam). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (Vora et Auckenthaler 2009).

ii) Résistance non enzymatique**✓ Perte de la porine OprD2**

Dans les bactéries Gram négatif, les porines bactériennes sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les β -lactamines et les fluoroquinolones (Pagès 2004). Cette protéine canalaire de la membrane externe possède un site spécifique de liaison aux carbapénèmes, et permet la pénétration sélective de l'imipénème. Des modifications de la quantité absolue ou de l'état fonctionnel de ces porines ont pour conséquence une diminution de la diffusion des antibiotiques empruntant cette voie de pénétration. Ce mécanisme par diminution de perméabilité peut entraîner une résistance croisée à plusieurs familles d'antibiotiques (Amine et al. 2008).

4.1.2.2 Résistance aux fluoroquinolones

Deux principaux mécanismes conduisent à la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* : des changements structurels dans les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV qui représentent les cibles des fluoroquinolones et l'efflux actif. Les fluoroquinolones, en particulier la ciprofloxacine, sont souvent utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*, ce qui a conduit à l'émergence de résistance acquise au sein de l'espèce. (J. K. Lee et al. 2005).

4.1.2.3 Résistance aux aminosides

Chez *P. aeruginosa* la pompe d'efflux MexXY est décrite comme la principale manifestation de la résistance aux aminosides, la modification de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides. *Pseudomonas aeruginosa* contient ainsi des enzymes de modification des aminoglycosides (Kettner *et al.* 1995).

4.2 Acinetobactere baumannii :

4.2.1 Résistance naturelle

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* produisent une bêta-lactamase chromosomique, très probablement de classe C, qui n'est pas inhibée par le clavulanate, qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération mais n'a pas d'activité pour les pénicillines et la pipéracilline. De ce fait, *Acinetobacter* est naturellement résistant à la céphalotine alors que la ticarcilline est active.

4.2.2 Résistance acquise

4.2.2.1 Résistance aux bêta-lactamines

i) Résistance enzymatiques

✓ Céphalosporinase de classe C

Différents mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été signalés et identifiés chez *Acinetobacter baumannii*. Liés principalement à la production de β -lactamases. *A. baumannii* produit une céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimé à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (Céphalotine) ou des carbapénèms.(Corvec *et al.* 2003).

✓ Oxacillinase de classe D

Les oxacillinases en général hydrolysent l'oxacilline, la méthicilline, cloxacilline et la benzylopénicilline, et leur activité est inhibée par NaCl C Héritier, **2005[159]**. De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des β - lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G(Cattoir *et Bicêtre* 2008).

✓ Métallo- β -lactamases de classe B

Les β -lactamases de classe B ont besoin d'un atome de zinc pour détruire les β -lactamines [161], elles sont inhibées par l'EDTA (Ruppé 2010). Cette classe d'enzyme hydrolyse tous les β -lactamines à l'exception des monobactames (Conly *et al.* 2011).

✓ β -actamases à spectre élargi

Chez *A. baumannii* les BLSE sont soit chromosomiques ou plasmidiques. Les gènes correspondant à ces BLSE sont le plus souvent retrouvés dans des structures de type intégron comme gènes cassettes et donc sous la dépendance de promoteurs situés à l'extrémité 3' du gène de l'intégrase. (Sinha, Srinivasa, et Macaden 2007).

ii) Résistance non enzymatiques**✓ Surexpression du système d'efflux**

Les pompes à efflux illustrent un phénomène unique dans la résistance aux médicaments: Un seul mécanisme provoquant la résistance contre les différentes classes d'antibiotiques. *A. baumannii* possède une pompe à efflux Ade ABC dont les substrats sont : Aminoglycosides, les tétracyclines, l'érythromycine, au chloramphénicol, triméthoprim, fluoroquinolones, des bêta-lactamines, et encore récemment, la tigécycline.

✓ Modification de l'expression des PLP

L'efficacité des bêta-lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP. La liaison antibiotique / cible est liée à la structure de la cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique (Fatoumata 2004).

4.2.2.2 Résistance aux quinolones

Deux principal mécanismes impliqués dans la résistance : - des mutations au niveau des gènes à l'origine de l'ADN gyrase et du topoisomérase IV, enzymes qui permettent le maintien de l'intégrité de l'hélice pendant le processus de réplication de l'ADN, ces mutations induisent des cassures dans l'ADN conduisant à la mort bactérienne. - des systèmes d'efflux qui jouent un rôle important dans la résistance aux fluoroquinolones (Cattoir 2012).

4.2.2.3 Résistance aux aminosides

La résistance d'*A. baumannii* aux aminosides résulte principalement de l'inactivation de l'antibiotique par certains enzymes de modification. *A.baumannii* possède une pompe à efflux de type Ade ABC qui confère la résistance à divers classes d'antibiotiques y compris les aminosides, elle est composée de protéines AdeA, AdeB et AdeC (Moniri *et al.* 2010).

4.2.2.4 Résistance aux autres antibiotiques

La résistance à haut niveau est due à l'acquisition d'un gène de résistance porté par un plasmide qui porte également des gènes de résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la kanamycine, à la streptomycine et au sulfa-méthoxazole (Magnet et Blanchard 2005).

Chapitre III Emergence mondiale des carbapénèmases

Ces dernières années, les carbapénèmes sont devenues les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices de BLSE. Cependant, comme pour toutes les β -lactamines mises sur le marché, des souches résistantes sont apparues (Cuzon *et al.*, 2010b). La première description d'une carbapénémase produite par des entérobactéries (NmcA) a été rapportée en 1993 (Naas et Nordmann 1994).

1. Les carbapénèmases de classe A d'Ambller

Les carbapénèmases de classe A confèrent une résistance à toutes les β -lactamines. Elles sont peu inhibées par l'acide clavulanique, mais sont sensibles à l'action inhibitrice de l'acide boronique qui est parfois utilisé dans leur test de détection (Robin, Gibold, et Bonnet 2012). Les premières enzymes de ce groupe ont été découvertes chez des entérobactéries de l'environnement. Il s'agit des β -lactamases chromosomiques NMC-A, SME, IMI-1 et SFC-1 (Walther-Rasmussen et Højby 2007). Ensuite, des enzymes à support plasmidique, KPC et GES, ont été découvertes (Laurent Poirel, Pitout, et Nordmann 2007). Les KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) sont les carbapénèmases de classe A, les plus fréquentes et les plus menaçantes (Patrice Nordmann, Cuzon, et Naas 2009). Les variants KPC-2 et KPC-3 sont les plus répandus dans le monde (Pfeifer, Cullik, et Witte 2010).

La première souche exprimant KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase) fut identifiée dans une souche de *Klebsiella* en Caroline du Nord aux États - Unis en 1996 (Yigit *et al.* 2001), et depuis lors, ces isolats se sont répandus dans le monde entier et ont devienent endémiques dans certains pays (Porres-Osante *et al.* 2014).

Depuis la découverte de KPC-1/2, l'incidence des souches de *K. pneumoniae* productrices de KPC n'a cessé d'augmenter dans plusieurs régions du globe, notamment aux États-Unis, en particulier dans l'état de New-York, en Grèce et en Israël (Bratu *et al.* 2005; Patrice Nordmann, Cuzon, et Naas 2009; Pournaras *et al.* 2009). La première épidémie de *K. pneumoniae* productrices de KPC en dehors des États-Unis a été décrite en Israël, où la situation semble maintenant endémique (Leavitt *et al.* 2007; Patrice Nordmann, Cuzon, et Naas 2009). Un clone unique de *K. pneumoniae* productrice de KPC-3 et plusieurs clones de *K. pneumoniae* productrices de KPC-2 sont responsables des épidémies actuelles dans les hôpitaux de Tel Aviv. La souche productrice de KPC-3 d'Israël, génétiquement liée à celles rapportées aux États-

Unis, suggère un échange de souches par le biais des voyages et des transferts de patients. Il a également été montré que certains clones de *K. pneumoniae*, tels le ST258, jouaient un rôle important dans la diffusion des enzymes de type KPC, même au niveau international (Kitchel et al. 2009). En Europe, en dehors de la Grèce, les cas décrits restent rares, souvent sporadiques et importés. En France, une dizaine de souches productrices de KPC ont actuellement été décrites : il s'agissait dans tous les cas de souches productrices de KPC-2 ou 3 (*K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*). Toutes étaient d'origine importée et isolées chez des patients précédemment hospitalisés à New York, en Grèce ou en Israël (Naas et al. 2005; Petrella et al. 2008). Récemment, une petite épidémie de quatre cas de *K. pneumoniae* productrices de KPC-2 et de SHV-12 a été décrite dans un hôpital parisien, le cas index étant un patient venant de Crète (Kassis-Chikhani et al. 2010). Dans le reste du monde, comme en Chine, en Amérique du Sud, les enzymes KPC sont de plus en plus rapportées figure 7 (Cai et al. 2008; Pasteran et al. 2008).

En Algérie, la détection de l'enzyme carbapénémase KPC (Variante KPC-3) a été signalé pour la première fois par Bakour en 2014. (Sofiane Bakour et al. 2014). En effet, cette enzyme a été identifiée dans *K. pneumoniae* isolé chez un enfant de 6 mois atteint d'hydrocéphalie admis au service de neurochirurgie du Hôpital universitaire de Sétif Algérie. (S. Bakour, Sahli, et al. 2015). En 2019, Gharout-Sait et al. ont signalé le deuxième cas d'infection à *K. pneumoniae* productrice de KPC-3 dans des isolats non cliniques (chez le guano de chauve-souris) à La grotte d'Aokas de Bejaia, Algérie. (Gharout-Sait et al. 2019).

En Tunisie, Charfi-Kessiss et al. 2014 ont montré récemment la première description de la β -lactamase GES type (GES-11) produite par *A. baumannii* (Figures 8,9) (Charfi-Kessiss et al. 2014)

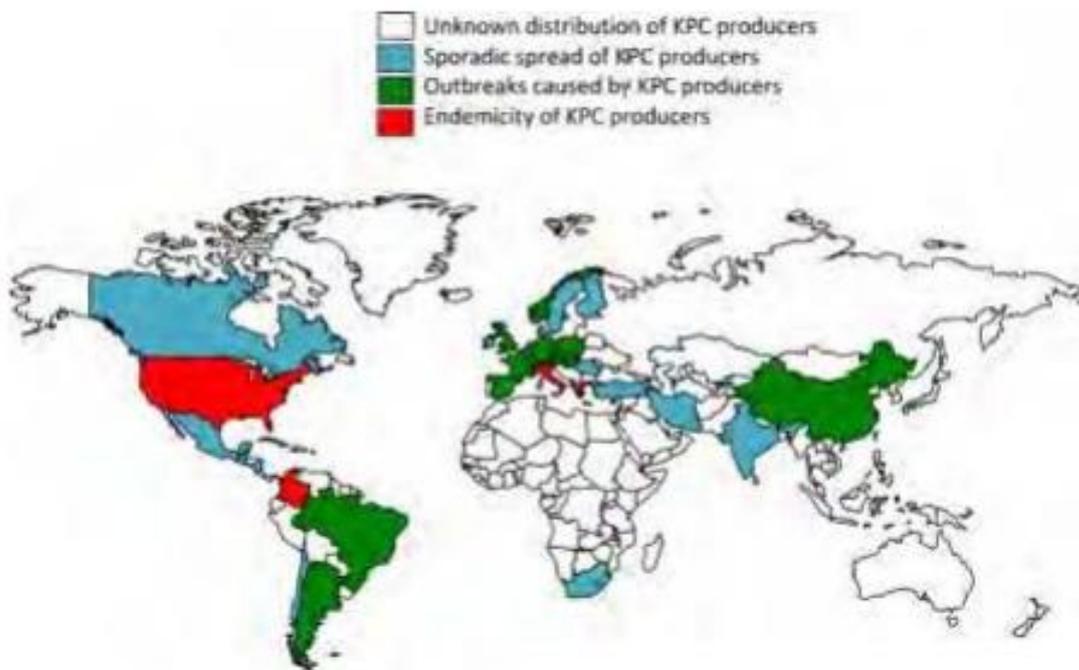


Figure 8.: Distribution mondiale des EPC KPC(Nordmann, 2014)



Figure 9: Prévalence géographiques des carbapénèmes de classe A et de leurs bactéries Gram négatives productrices de correspondants dans le bassin méditerranée(Mathlouthi et al., 2017)

2. Les carbapénèmases de classe B d'Ambller

Les carbapénèmases de classe B ou métallo- β -lactamases (MBL) sont essentiellement des enzymes de type IMP (IMiPénèmase) ou VIM (Verona Integron–encoded Metallo- β -lactamase) responsables d'épidémies hospitalières sévères des souches d'entérobactéries dans certains pays, particulièrement en Asie et en Europe de sud (Loli et al. 2006; Queenan et Bush 2007; Vatopoulos 2008; Walsh et al. 2005). Les enzymes IMP ont été initialement décrites à la fin des années 80 au Japon, chez des souches hospitalières de *S. marcescens* (Osano et al. 1994). Depuis, 52 types d'enzymes IMP ont été identifiées à travers le monde. En effet, dans le bassin méditerranéen une seule étude effectuée au Maroc a signalé la présence de variant IMP-1 chez une souche d'*E. coli* uropathogène (Barguigua et al. 2013).

Quelques études ont rapporté la présence des enzymes de type VIM chez des souches cliniques isolées dans les pays de la méditerranée. VIM-1 a été détectée en Espagne (Tórtola et al., 2005) et en Egypte (Abdelaziz et al., 2013; Poirel et al., 2012), VIM-19 et VIM-4 a été identifiée en Algérie (Mellouk et al. 2017; Robin et al. 2010) et en France chez un patient algérien (Rodriguez-Martinez et al. 2010) et VIM 29 a été également signalée en Egypte (Abdelaziz et al. 2013).

Plus récemment, une nouvelle carbapénémase, la New Delhi métallo- β -lactamase-1 (NDM-1) a été identifiée chez *K. pneumoniae* et *E. coli* isolées en 2008 chez un patient suédois précédemment hospitalisé à New-Delhi, en Inde (Yong et al. 2009). NDM-1 représente la MBL la plus identifiée dans le bassin méditerranéen figure 9. (Birgy et al. 2011; El-Herte et al. 2012; Gaibani et al. 2011; Solé et al. 2011).

En Algérie, trois études seulement ont rapporté l'émergence du NDM-1, mais chez des souches cliniques d'*A. baumannii* (Sofiane Bakour et al. 2014; Boulanger et al. 2012; Mesli et al. 2013). Cependant, pour *E. coli*, NDM-5 reste le seul variant qui a été identifié dans ce pays (Sassi et al. 2014; Yaici et al. 2016; Massilia Yousfi et al. 2016; M. Yousfi et al. 2015). Récemment, une étude a été rapporté aussi l'émergence du NDM-1 chez les *K. pneumoniae* pour la 1^{er} fois en Algérie (Abderrahim et al. 2017). Le variant NDM-7 a été également détecté, en France, chez des souches cliniques d'*E. coli* (Figures 10,11) (Cuzon, Bonnin, et Nordmann 2013).

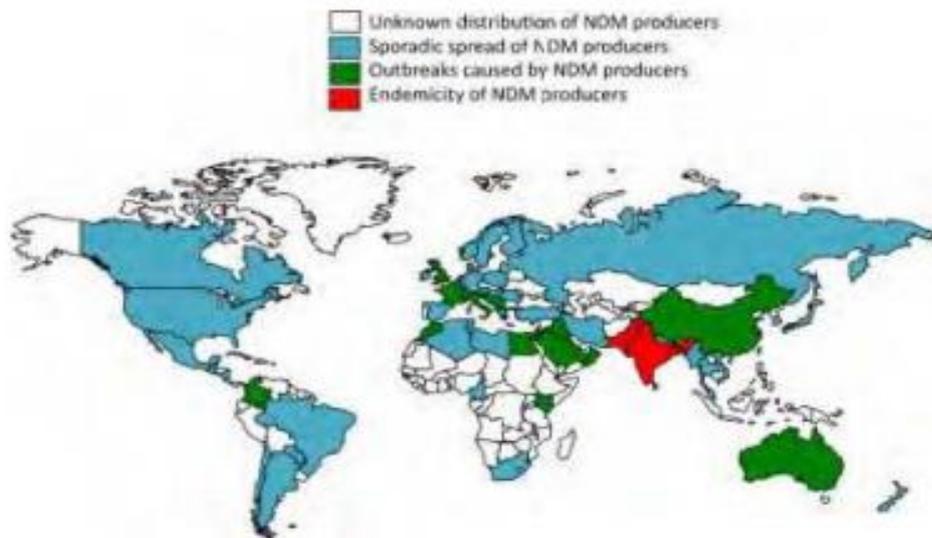


Figure 10: Distribution mondiale des EPC NDM(Nordmann, 2014)

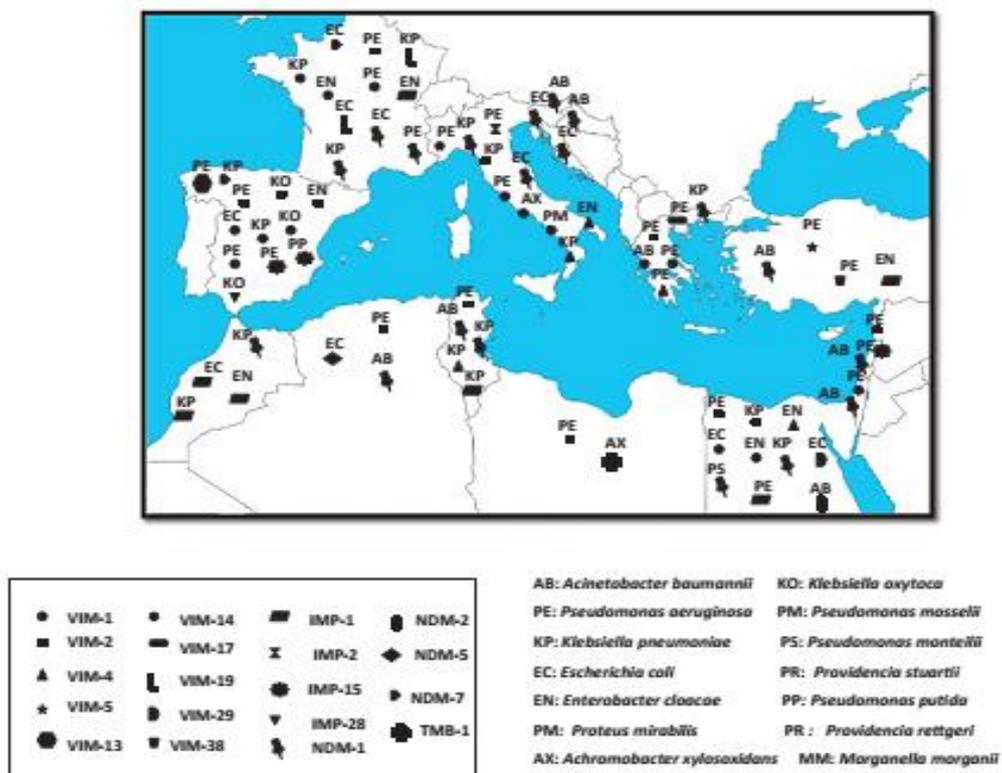


Figure 11: Prévalence géographique des carbapénèmes de classe B et de leurs bactéries Gram négatives productrices de correspondants dans le bassin méditerranée (Mathlouthi *et al.*, 2017)

3. Les carbapénèmases de classe D d'Ambler

Les β -lactamases de Classe D, nommées également OXA pour oxacillinase, ont plus de 440 variants connus avec 232 présentant une activité carbapénémase (Patrice Nordmann, Boulanger, et Poirel 2012). Initialement, les OXA β -lactamases ont été signalées chez *P. aeruginosa*. Par la suite, ces carbapénèmases ont été détectées chez de nombreuses autres bactéries à Gram négatif, y compris les entérobactéries (Pfeifer, Cullik, et Witte 2010). Parmi ces enzymes, OXA-48 représente la carbapénémase la plus fréquemment isolée chez les entérobactéries (Patrice Nordmann, Boulanger, et Poirel 2012; Patrice Nordmann, Naas, et Poirel 2011). Elle a été identifiée pour la première fois chez une souche de *K. pneumoniae* en Turquie (Laurent Poirel et al. 2004). Depuis, les bactéries productrices d'OXA-48, ont très largement émergé dans tous les pays du pourtour méditerranéen et en Afrique (Djahmi et al. 2014; Patrice Nordmann, Naas, et Poirel 2011). Le Moyen-Orient et le Nord d'Afrique sont considérés comme des réservoirs de souches productrices d'OXA-48 (Laurent Poirel et al. 2012).

Cette enzyme est parmi les carbapénèmases les plus répandues, elle a été détectée en France (Laurent Poirel et al. 2012), en Italie (Giani et al. 2012), en Turquie (Gülmez et al. 2008; Kilic et al. 2011), au Liban (Baroud et al. 2013), au Maroc (Barguigua et al. 2013), en Egypte (Abdelaziz et al. 2013) et plus récemment en Algérie (Agabou et al. 2014; Massilia Yousfi et al. 2016). (Figures 12,13)

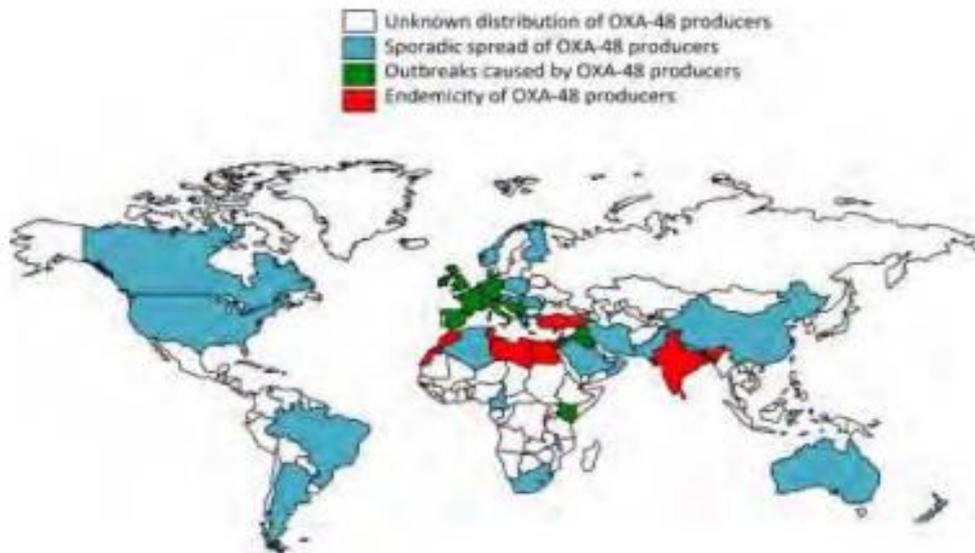


Figure 12: Distribution mondiale des EPC OXA-48-like (Nordmann, 2014)

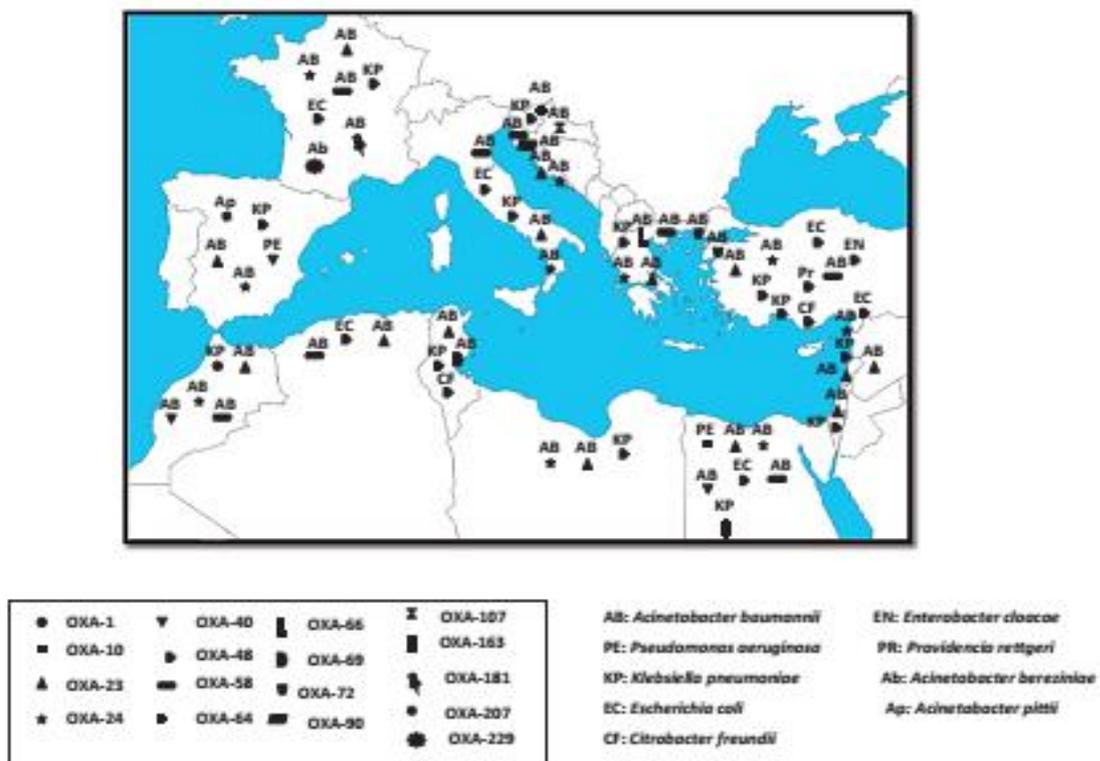


Figure 13: Prévalence géographiques des carbapénèmes de classe D et de leurs bactéries Gram négatives productrices de correspondants dans le bassin méditerranée (Mathlouthi et al., 2017)

Matériel et méthodes

1. Lieu et période d'étude :

Une partie de cette étude s'est déroulée au sien du laboratoire de Microbiologie, sous la direction du Pr NEDJAI Sabrina hôpital Ibn Rochd CHU d'Annaba.

La confirmation de l'identification des souches bactériennes par automate et l'étude moléculaire a été réalisée au niveau du laboratoire d'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France sous la direction du Pr Jean Marc Rolain.

Une collection de 114 souches de Bacilles à Gram négatif a été récupérée au cours d'une période de 3 années (janvier 2015 à décembre 2017) au service d'urologie de l'hôpital Ibn Rochd CHU d'Annaba.

2. Critères d'inclusion :

Toute souche à Gram négatif de sensibilité diminuée a l'ertapeneme ou l'imepeneme et BLSE est incluse dans l'étude.

3. Données des patients :

Les informations recueillies sur chaque patient sont les suivantes : sexe, âge, date de prélèvement, type de prélèvement. Ces renseignements ont été recueillis et enregistrés sur le registre des prélèvements du laboratoire microbiologie.

4. Prélèvements et transports :

Les prélèvements bactériologiques sont pratiqués par l'équipe médicale et paramédicale de service d'urologie et acheminés vers le laboratoire de microbiologie (Ibn Rochd CHU d'Annaba.)

Les prélèvements reçus au laboratoire sont les suivants : prélèvements d'urine, prélèvements vaginaux, sondes urinaires, pus, liquide kystique, drain de néphrostomie.

5. Collection et conservation des souches :

Les souches provenant de patients hospitalisés dans le service d'urologie et de divers prélèvements ont été identifiées par galerie API20E et API20NE (Bio Mérieux, France) au sein du laboratoire de Microbiologie. La conservation des souches a été réalisée dans des tubes de conservations.

6. Identification

Après des tests usuels de bactériologie (coloration de Gram, examen à l'état frais, catalase et oxydase). Les souches bactériennes ont été identifiées par les galeries biochimiques API20E pour les bactéries non oxydatives (entérobactéries), API20NE pour les bacilles à Gram négatif non fermentants dans les laboratoires de microbiologie.

L'identité des souches a été confirmée par spectrométrie de masse en utilisant un spectromètre de masse MALDI-TOF (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) à l'Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France

6.1 Identification par Api système (bioMérieux)

✓ **API 20 E** est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae , comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés dans des microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.

✓ **Api 20 NE** est aussi un système standardisé pour l'identification des BGN non entérobactéries, elle comporte 20 microtubes combinant 8 tests conventionnels qui sont inoculés avec une suspension bactérienne et 12 tests d'assimilation inoculés avec un milieu minimum.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe 01 et 02) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification. (ApiWeb-bioMérieux).

6.2 Identification des souches par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Identification des souches a été confirmée par spectrométrie de masse en utilisant un spectromètre de masse MALDI-TOF (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse, 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) (Seng et al. 2010). La principale fonction de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, en microbiologie clinique, est l'identification des microorganismes par l'analyse de leurs protéines totales. la spectrométrie de masse combinée à une désorption-ionisation laser assistée par une matrice, d'une bactérie

isolée, permet de réaliser cette identification en quelques minutes et avec une haute précision. (Seng et al. 2010).

➤ **Matériel et Réactifs (Matrice)**

- Hotte chimique (Trionyx).
- Bain à ultrasons (Fisher).
- Centrifugeuse (Sigma).
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) (Thermo).
- Spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker).
- Cible (support métallique en acier inoxydable avec 96 puits) (Bruker).
- Alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) (Sigma).
- Trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma).
- Eau HPLC.
- Acétonitrile HPLC.
- Ethanol HPLC.
- Bacterial test standard (255343, Bruker).

➤ **Protocole**

• **Nettoyage de la cible**

Manipulation à réaliser sous hotte chimique avec des gants.

1. Rincer la cible sous l'eau chaude du robinet en frottant avec le papier de précision (type Kim Wipes) afin de ne pas la rayer, puis rincer avec de l'éthanol à 70% en frottant avec du papier de précision.
2. Répéter la première étape.
3. Placer la cible dans un petit réservoir en inox ou en céramique et la recouvrir d'éthanol à 70%.
4. Laisser agir pendant 15 min puis éliminer l'éthanol dans la poubelle appropriée.

5. Déposer sur la cible 500µl de TFA 80%. Frotter avec du papier de précision (sous la hotte chimique).

6. Rincer la cible avec de l'eau HPLC et laisser sécher 15 minutes à l'air libre.

- **Préparation de la matrice**

Le protocole de la préparation de la matrice consiste à mélanger dans un tube Eppendorf, sous hotte chimique, 1mg d'alpha-cyano-4hydrocinnamic acide, 500 µl d'acétonitrile HPLC, 250 µl de TFA à 10%(acide trifluoroacétique) et 250 µl d'eau ultra-pure MilliQ. Ce mélange est par la suite soniqué pendant 10 min dans un bain à ultrasons et centrifugé 5 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube Eppendorf propre et la matrice qui permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident, est ainsi prête à l'utilisation. La solution ainsi obtenue est qualifiée de « solution stock ».

- **Préparation du témoin positif (T+)**

1. Préparer 1 ml de (solution stock) : 475 µl d'eau HPLC + 25 µl de TFA + 500 µl d'acétonitrile HPLC.

2. Mélanger la solution stock.

3. Ajouter 500 µl de cette solution stock dans un tube de bacterial test standard (#255343, Bruker).

4. Fermer les tubes et mélanger. Laissez reposer 5 minutes.

5. Le BTS est prêt à l'emploi et peut être conservé en aliquotes de 10 µl pendant 6 mois à – 20°C. Le témoin négatif est la matrice seul (1.5 µl de matrice).

- **Préparation des échantillons pour analyse spectrométrique**

Sous PSM (poste de sécurité microbiologique), les bactéries à identifier sont prélevées à partir d'une culture bactérienne de 24 heures et déposées sous forme d'un fin frottis homogène sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris de laser. Pour chaque souche, 4 spots déposés pour réduire le risque d'erreur. Par la suite, 1.5 µl de la matrice sont ajoutés sur chaque spot et le mélange est séché sous hotte pendant 15 minutes pour permettre la co-cristallisation de la matrice avec l'échantillon bactérien.

• **Insertion de la cible et la mise en route de MALDI-TOF**

La cible est ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et exposé sous –vide aux tris du laser. Une fois la fiche de logiciel MALDI Biotyper Automation Control remplie le spectromètre de masse : Microflex est lancé

• **Interprétation des résultats d'analyse spectrométrique**

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. Les résultats sont exploitables seulement si les T+ correspondent à *E. coli* avec un score > 1.9 et les T- correspondent à un score sans identification < 1.7. Tableau 1, (Figure 14). (Seng et al. 2010).

Tableau 1: Les résultats d'identification sous Biotyper

Score	0-1.7	1.7-1.9	1.9-3
Couleur	Rouge	jaune	Vert
Identification	Aucune	Gène bactérien	Espèce bactérienne

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 organisme, plus précisément le logiciel Biotyper MALDI dose les protéines très abondantes rencontrées dans tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue et ouverte pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. L'indentification d'une bactérie est fiable lorsque le score d'identification est supérieur à 1.9. L'acquisition des spectres de lance automatiquement avec logiciel Flex Contol(Seng et al. 2010).



Figure 14: Protocole de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS.

7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des 114 souches vis-à-vis de 16 antibiotiques pour les entérobactéries (tableau2) et aussi pour les bactéries à Gram négatif non fermentaires (tableau3) est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines (www.eucast.org);

Des boîtes de gélose Mueller Hinton (BD Difco) sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne de 0.5 MacFarland diluée à 1/10ème (10⁷ bactéries/ml), et les disques d'antibiotiques (BioMérieux, France) y sont déposés à l'aide d'un distributeur automatiques puis incubées pendant 18 à 24h à 37°C. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

Tableau 2: Concentrations et diamètres critiques pour les entérobactéries

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
			S	R
Amoxicilline	AX	20	≥20	≤19
Amoxicilline+Acide clavulanique	AMC	20	≥18	≤13
Pipéracilline-tazobactam	TPZ	100	≥25	≤20
Céfépime	FEP	30	≥25	≤18
Céfalotine	KF	30	≥20	≤19
Céftriaxone	CRO	30	≥23	≤19
Ertapénème	ETP	10	≥22	≤18
Imipénème	IMP	10	≥23	≤19
Amikacine	AK	30	≥26	≤22
Gentamicine	GN	15	≥15	≤12
Ciprofloxacine	CIP	5	≥26	≤21
Colistine	CS	50	≥15	≤12
Fosfomycine	FF	200	≥24	≤24
Nitrofurantoïne	F	300	≥17	≤14
Doxycycline	DO	30	≥14	≤10
Triméthoprim + sulfaméthoxazole	SXT	25	≥16	≤10

Tableau 3: Concentrations et diamètres critiques pour les BGN-NF

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	Diamètres critiques (mm)	
			S	R
Ticarcilline	TIC	75	≥20	≤14
Ticarcilline-clavulanate	TCC	75+10	≥20	≤15
Céfépime	FEP	30	≥18	≤14
Céftazidime	CAZ	30	≥18	≤14
Imipénème	IMP	10	≥19	≤15
Pipéracilline-tazobactam	TZP	100	≥21	≤17
Ciprofloxacine	CIP	5	≥25	≤18
Amikacine	AK	30	≥17	≤16
Gentamicine	GN	10	≥15	≤12
Colistine	CT	50	≥15	≤12
Nitrofurantoïne	F	300	≥12	≤11
Fosfomycine	FF	200	≥24	≤24
Doxycycline	DO	300	≥13	≤9
Tobramycine	TOB	10	≥15	≤12
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	SXT	25	≥16	≤10
Rifampicine	RA	30	≥22	≤17

8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice par E-test

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. La blondelette E- test est une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient pré-établi de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0.016 à 256 µg/ml ou de 0.002 à 32 µg/ml selon antibiotique. L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage sur gélose Muller Hinton. Lorsqu'une blondelette 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 contenu 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 indique la valeur de CMI, exprimée en $\mu\text{g/ml}$. Dans cette étude les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'imipenème ont été déterminées pour toutes les souches IMP Ret ERT R en utilisant la méthode E-test (BioMérieux, France) (Figure 15)

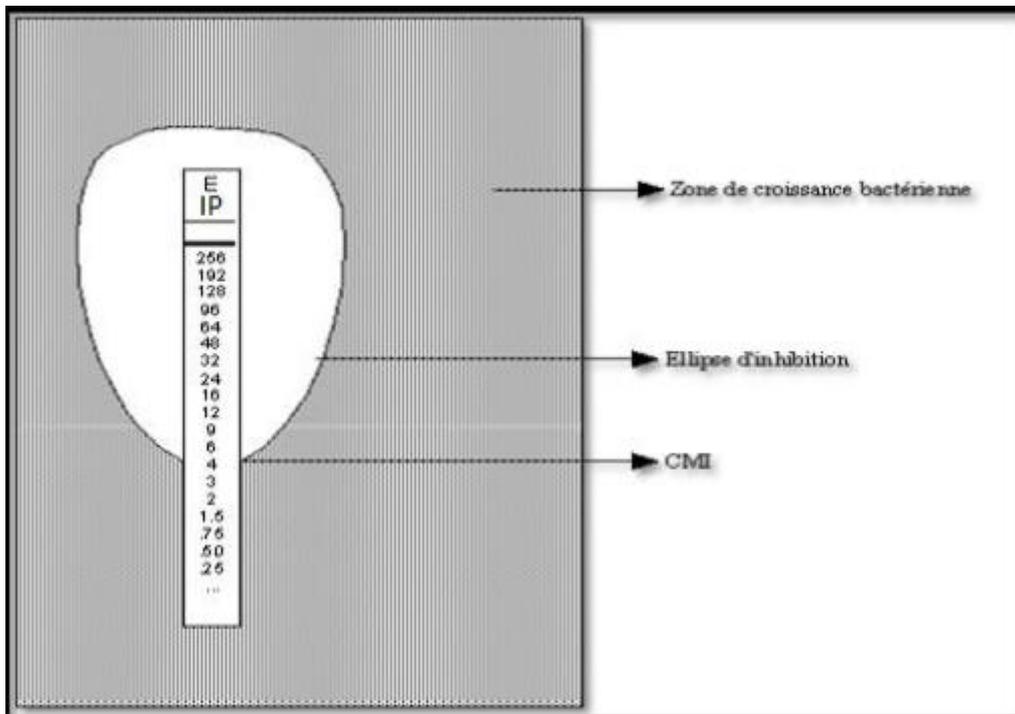


Figure 15: Détermination de CMI par E-test

9. Détection phénotypique des B-lactamases

9.1 Recherche de la production des BLSE

Différents tests phénotypique sont recommandés pour la détection des souches productrices de BLSE. Dans notre étude on s'est basé sur le test de synergie, ce test consiste à la recherche des éventuelles images de synergie en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » qui peuvent apparaître, sur gélose, entre les molécules d'amoxicilline-acclavulanique et une céphalosporine de 3ème génération sur la gélose Mueller-Hinton selon la technique standard 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. La distance entre deux disques est de 30 mm centre à centre. Les boites de Pétri sont incubées 18 heures à 37°C(Rahal 2010).

Le test de synergie est 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.

9.2 Recherche de la production des carbapénèmases

La recherche des carbapénèmases par les tests phénotypiques a été réalisée suite aux résultats de l'antibiogramme lorsqu'une résistance très élevée à l'imipénème a été noté. L'intérêt porté à cet antibiotique est dû à son utilisation comme le traitement de choix des infections causées par les BGN de notre étude.

9.2.1 Détection des carbapénèmases par le Carba NP test modifié

Le Carba NP test modifié est un test biochimique basé sur l'identification de la production de carbapénémase chez les bactéries à Gram négatif par la détection accélérée de l'hydrolyse de l'imipénème en utilisant le rouge de phénol pH 7 comme indicateur coloré. Ce tests permet la détection des différents types de carbapénémase (KPC, MBL, et OXA), après 15 minutes à 2 heures(S. Bakour, Garcia, *et al.* 2015).

➤ Réactifs et protocole

- Imipénème (Merck Sharp & Dohme, France) (Poudre pour solution injectable).
- Tampon de lyse: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Sigma-Aldrich).
- Rouge de Phénol en poudre (Sigma-Aldrich).
- ZnSO₄, 7 H₂O en poudre (Sigma-Aldrich).

* La solution A (solution contenant l'indicateur de pH) est préparée comme suit :

- 1- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0.5% poids/volume.
- 2- Mélanger 2ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6ml d'eau distillée.
- 3- Ajouter au mélange 180µl d'une solution de ZnSO₄ 10mM.
- 4- Ajuster le pH à 7 avec une solution de NaOH (1 N).

*Pour détecter la production d'une carbapénémase, on procède comme suit :

- 1- Dans un tube Eppendorf, mettre 200µl de tampon de lyse (CTAB 0.02 %).
- 2- Suspendre un ose calibré (10µl) de colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer 1 à 2 min.

- 3- Transférer 100µl dans 2 tubes Eppendorf "A" et "B".
- 4- Ajouter 100µl de Solution A dans le tube Eppendorf "A" et 100µl de la Solution A+imipénème 6mg/ml dans le tube Eppendorf "B".
- 5- Vortexer 5 sec, puis incuber à 37°C pendant un maximum de 2h.

La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube Eppendorf et les résultats sont interprétés selon le tableau 4 et la figure 16 .(S. Bakour, Garcia, et al. 2015).

Tableau 4: Interprétation des résultats de MCNP

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production de carbapénèmase
Rouge	Orange/ Jaune	Production de carbapénèmase
Jaune	Jaune	Ininterprétable

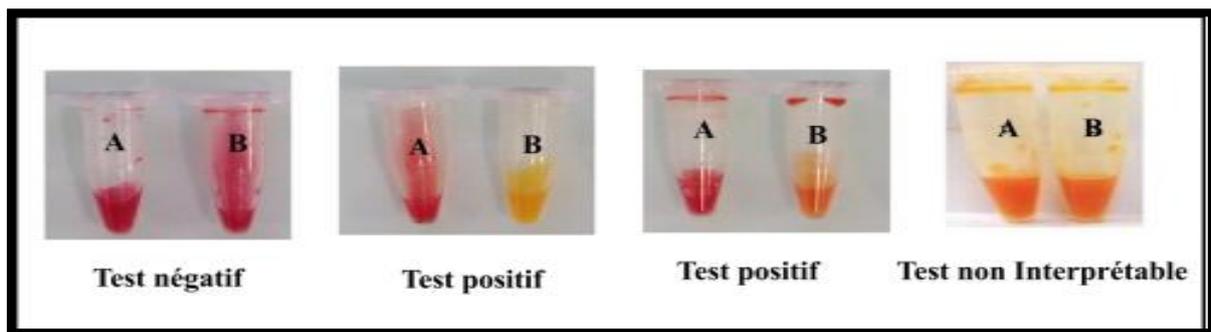


Figure 16: Interprétation du CARBA NP test modifié. A : Témoin négatif ; B : Solution contenant le rouge de phénol+imipénème à 6mg/ml+CTAB

9.2.2 Détection de carbapénèmases par le test Hodge modifié

Le test de Hodge est le test phénotypique le plus connu. Il est le seul permettant d’objectiver la production de carbapénemase de type OXA.

La souche à tester, le témoin positif (T+, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705) et le témoin négatif (T-, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706) sont ensemencés sous forme de stries déposés à partir du centre jusqu’à la périphérie de la boîte contenant la gélose MacConkey, préalablement ensemencée avec la souche d’ *Escherichia coli* ATCC 25922. Puis, un disque d’ertapénème (ou imipénème cas des *A. baumannii* et *P. aeruginosa*) est appliqué au centre et la boîte est incubée

à 37°C pendant une nuit. La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* indique la présence d'une carbapénémase (K. Lee *et al.* 2010).

Ce test est parfois faussement positif pour les souches ayant un défaut d'accumulation des carbapénèmes associé à la production de céphalosporinase et/ou BLSE. (Robin, Gibold, et Bonnet 2012).(Figure 17)

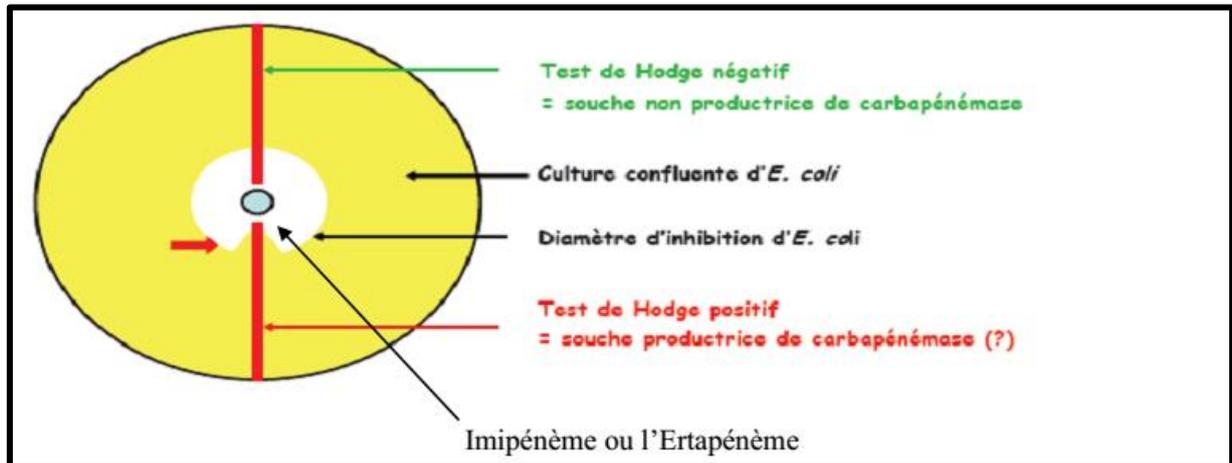


Figure 17: Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénémases

9.2.3 Détection des méttallo-B lactamases(MBL) : l'EDTA Test

La recherche de MBL a été effectuée par le test de l'EDTA-disque synergie en utilisant une solution stérilisée par autoclavage d'EDTA à 0.5 M à pH 8. Deux disques d'imipénème (10µg) sont déposée suffisamment distants sur la même boîte de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton préalablementensemencer avec la souche à tester, l'un comme témoin et sur l'autre un volume de 5 µl de solution d'EDTA (750µg d'EDTA) est ajouté. En outre, 5µl de solution d'EDTA est ajouté sur un disque vierge (témoin négatif). Les diamètres des zones d'inhibitions autour de ces disques sont mesurés et comparés après 16 à 18 heures d'incubation à 37°C. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul d'au moins 6 mm sont considérées comme souches productrices de MBL.(Jeong *et al.* 2006).

10. Recherche moléculaire des B-lactamases et carbapenemases

Au cours de notre travail, on a recherché l'identification des β-lactamases à spectre étendu et les carbapenemases des souches résistantes aux carbapénèmes. La PCR en temps réel, la PCR standard et le séquençage ont été réalisés pour détecter la présence des gènes codant pour les BLSEs :*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} et les carbapenemases :*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, et *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM} ;

10.1 Extraction de l'ADN à partir des cultures bactériennes

L'extraction de l'ADN génomiques des isolats a été réalisée en utilisant le kit de tissu EZ1[®] ADN (Qiagen, Court a bœuf, France) avec l'extracteur EZ1 avancée XL et la carte de bactéries ADN (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

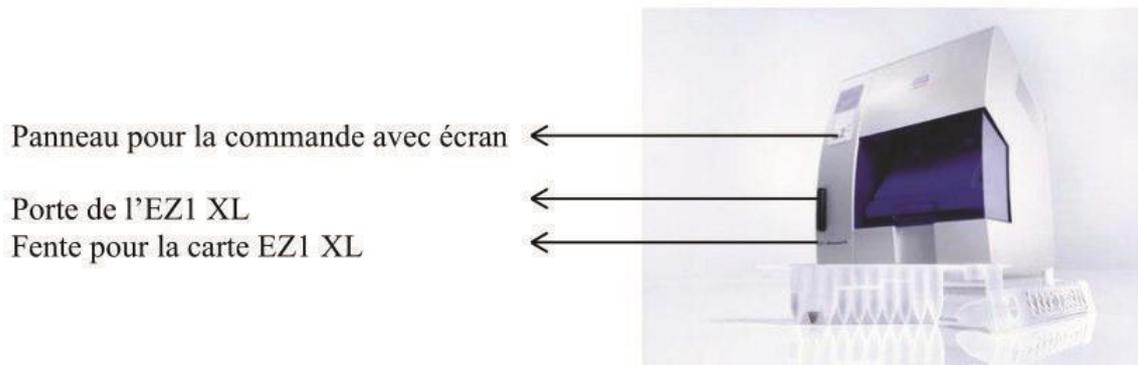


Figure 18: Extracteur EZ1 XL

➤ Protocole

1. Pipeter 200µl de l'eau distillée stérile et le mettre dans un tube à Eppendorf de 1.5 ml.
2. Remplir complètement l'intérieur d'une ose de microbiologie stérile avec des colonies isolées et les rajouter dans le tube à Eppendorf.
3. Vortexer pendant 15 s. afin d'obtenir une solution homogène.
4. Homogénéiser les cartouches de réactifs avant de les introduire dans les rails du support.
5. Mettre sous tension l'appareil EZ1 et suivre les instructions données sur l'écran.
6. Choisir le volume d'élution : 50 µl, 100 µl ou 200 µl
7. S'assurer que chaque élément (tubes ou tips) est correctement positionné et puis on lance le protocole. L'extraction dure 15 minutes.
8. Recueillir les acides nucléiques purifiés dans les tubes d'élution

Note : Pour une conservation à long terme, de plus de 24 heures, il est recommandé de conserver l'ADN entre -20 et -80 °C.

10.2 PCR en temps réel (RT-PCR)

La PCR en temps réel est réalisée pour détecter la présence des gènes codant pour carbapénémase *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC}* *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}* .et les gènes codant pour les BLSE *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*

La composition du mélange réactionnel utilisé dans la PCR en temps réel est donnée dans le tableau 5

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur pour RT-PCR (Stratagene MX 3000P, USA) selon le programme décrit ci-dessous. (Figure 19)

Tableau 5: Composition du mélange réactionnel pour les RT-PCR

Composants	Quantité PCR en temps réel
Quantitect Probe PCR Master Mix	10 µl
Amorce Forward (0,02nmol/µl)	0,5 µl
Amorce Reverse (0,02nmol/µl)	0,5 µl
Sonde (0,002nmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O UTP	3,5 µl
ADN à amplifier	5 µl

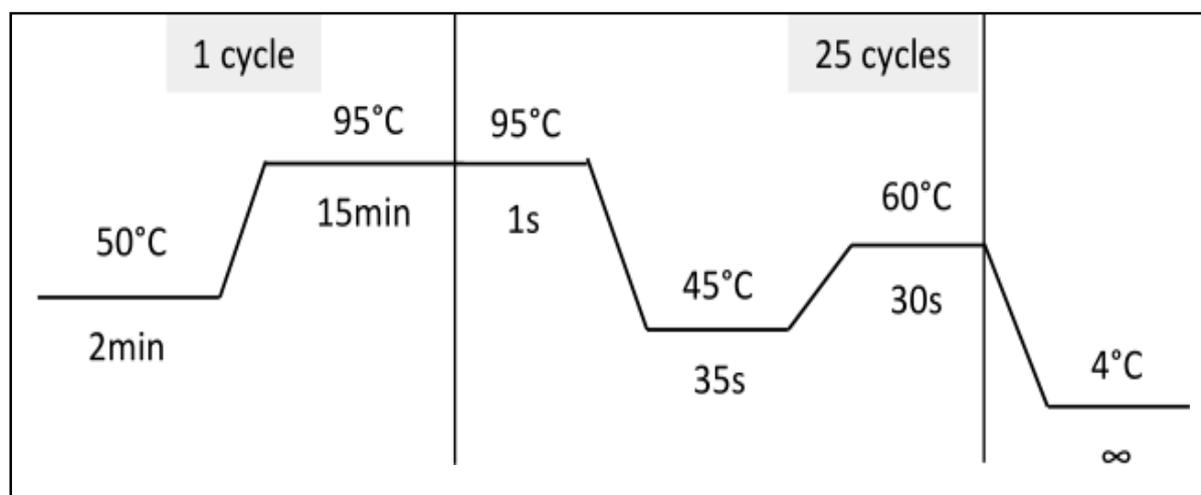


Figure 19: Programme de la RT-PCR

La PCR, en temps réel, est une technique qui repose d'une part sur l'amplification des acides désoxyribonucléiques (ADN) par une ADN polymérase, à partir d'amorces sens et anti-sens, et d'autre part sur la détection régulière d'un signal fluorescent émis par une sonde TaqMan®, qui porte à son extrémité 5' un Fluorophore et à son extrémité 3' un Quencher. Ce dernier absorbe la fluorescence du Fluorophore, on remarque qu'aucun signal n'est émis (Figure 20(A)). Un cycle de PCR, ou cycle d'amplification est composé d'une étape de dénaturation de l'ADN, suivie de l'hybridation des amorces sur leur séquence spécifique et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase. Les étapes d'hybridation et d'élongation peuvent être réalisées à la même température, ce qui permet de réduire considérablement le temps de la PCR en temps réel (Figure 20(B)).

Lors de la dénaturation, les deux brins d'ADN sont séparés, puis les amorces se fixent sur leur séquence cible au cours de l'hybridation. Pendant l'élongation, la polymérase qui possède une activité 5' exonucléase, va cliver la sonde TaqMan®. Le Fluorophore va donc s'éloigner du Quencher, qui n'absorbera plus la fluorescence émise par le premier, et un signal pourrait être détecté (Figure 20(B)). L'amplification par PCR, corrélée à un nombre de Fluorophore clivés (donc émettant un signal fluorescent) augmente exponentiellement (Figure 20(C)). Ceci va se traduire par une courbe de PCR en temps réel, retraçant l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycle PCR.

Au début, le signal fluorescent émis ne se démarque pas du bruit de fond. Ensuite, une phase exponentielle d'amplification du signal apparaît jusqu'à une phase plateau, correspondant au signal maximal détectable lorsque toutes les sondes ont été clivées. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un numéro de cycle PCR appelé "CT" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. Le cycle seuil correspond au nombre de cycle de PCR qui doivent avoir lieu avant le début de la phase exponentielle (Figure 18 (D)). Le protocole utilisé dans ce travail consiste à déposer 20 µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 5) dans chaque puit d'une plaque d'un Thermocycleur Stratagème MX 3000P. Cette dernière est ensuite introduite dans le thermocycleur selon le programme décrit dans la figure 19.

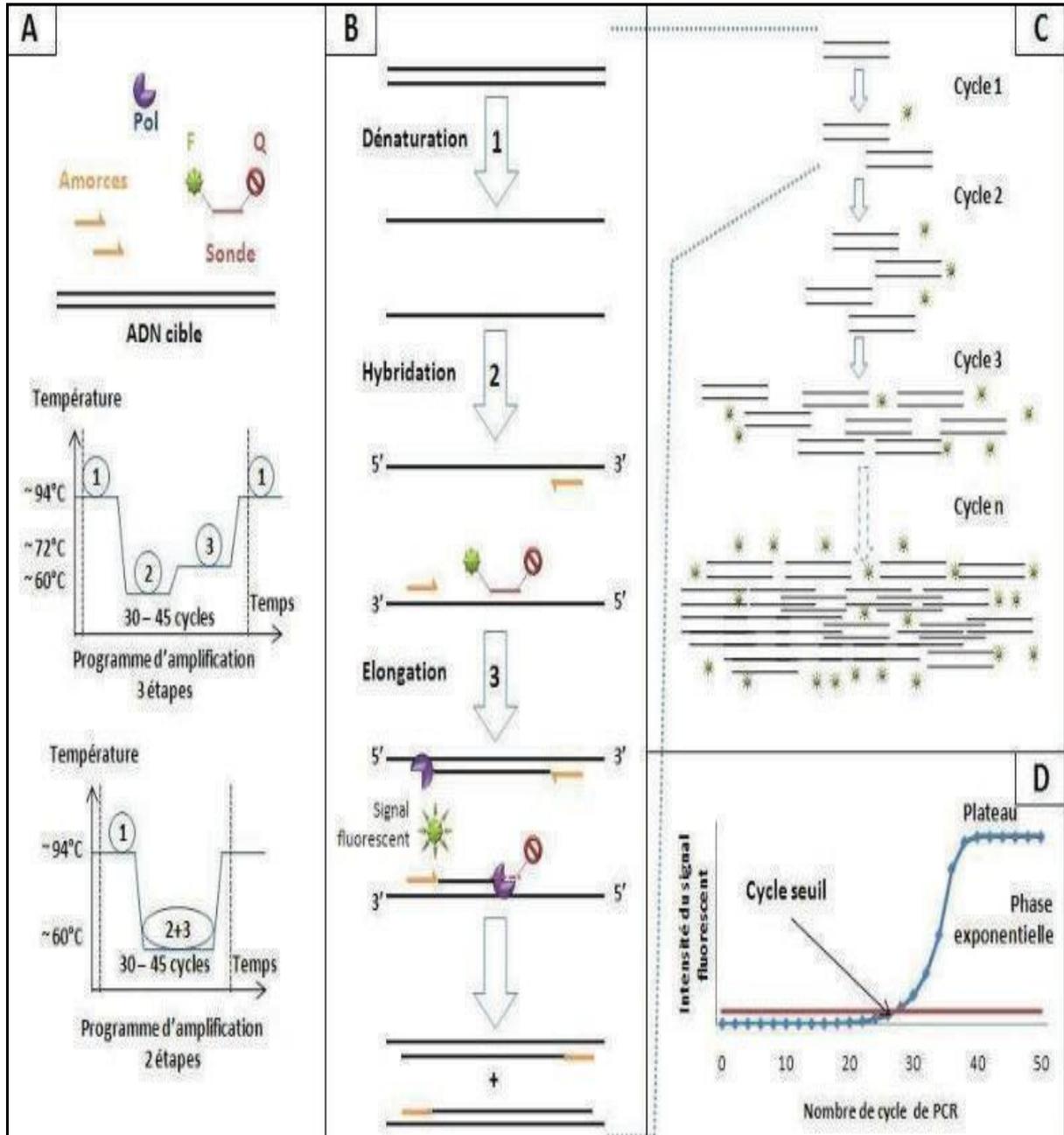


Figure 20: Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®)

Pol = Polymérase, F = Fluorophore, Q = Quenche

Tableau 6: Amorces et sondes utilisées pour les PCR en temps réel

Gene	Amorce	Séquence (5'-----3')	Taille (bp)	Référence
<i>bla_{OXA-51}</i>	OXA-51-F1 OXA-51-R1 OXA-51-probe	GCTCGTGCTTCGACCGAGTA TTTTTGCCCGTCCCCTTAAA FAM-TCGGCCTTGAGCACCATAAGGCA- TAMRA	117	(Diene et al. 2011)
<i>bla_{OXA-23}</i>	OXA-23-F1 OXA-23-R1 OXA-23-probe	TGCTCTAAGCCGCGCAAATA TGACCTTTTCTCGCCCTTCC FAM-GCCCTGATCGGATTGGAGAACCA- TAMRA	130	Diene et al.,2011
<i>bla_{OXA-24}</i>	OXA-24-F OXA-24-R OXA-24-probe	CAAATGAGATTTTCAAATGGGATGG TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT FAM-GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA- TAMRA	123	Diene et al.,2011
<i>bla_{OXA-58}</i>	OXA-58-F OXA-58-R OXA-58-probe	CGCAGAGGGGAGAATCGTCT TTGCCCATCTGCCTTTTCAA FAM-GGGGAATGGCTGTAGACCCGC- TAMRA	102	Diene et al.,2011
<i>bla_{NDM-1}</i>	NDM-1-F NDM-1-R NDM-1-probe	GCGCAACACAGCCTGACTTT CAGCCACCAAAGCGATGTC FAM-CAACCGCGCCCACTTTGGC- TAMRA	155	Diene et al.,2011
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-48-F OXA-48-R OXA-48-probe	TCTTAAACGGGCGAACCAAG GCGTCTGTCCATCCCCTTA FAM-AGCTTGATCGCCCTCGATTTGC- TAMRA	125	(Rolain, Canton, et Cornaglia 2012)
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F KPC-R KPC-probe	GATACCACGTTCCGTCTGGA GGTCGTGTTCCCTTTAGCC FAM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA	180	Rolain et al., 2012
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F VIM-R VIM-probe	CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA GCGTACGTYGCCACYCCAGCC FAMAGTCTCCACGCACTTTTCATGACCGCGTCGGC G-TAMRA	132	JM-lab
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M F CTX-M R CTX-M Probe	CGGGCRATGGCGCARAC TGCRCGGTSGTATTGCC CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC	105	Roschanski et al., 2014

<i>bla_{TEM}</i>	TEM F TEM R TEM Probe	TTCTGCTATGTGGTGCGGTA GTCCTCCGATCGTTGTCAGA AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTAGA	213	Mesli et al.,2013
<i>bla_{SHV}</i>	SHV F SHV R SHV Probe	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA TCCTGCTGGCGATAGTGGAT TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG	105	Roschanski et al., 2014

10.3 Polymérase Chaîne Réaction (PCR) standard

La PCR standard est utilisée pour l'amplification des gènes qui codent pour les B-lactamases de la classe A d'Ambler et de classe D d'Ambler : *bla_{KPC}* et *bla_{OXA-48}*. Les gènes de BLSE : *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*.

La réaction PCR permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un gène donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réaction permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répété 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'ADN double brin, il faut agir en trois étapes :

- (i) Dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simples brins.
- (ii) Borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques.
- (iii) Réalise la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin. (Figure 22)

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR standard est le suivant : dans une plaque BioRad , 25 µl du mélange réactionnel sont déposés dans chaque puit (tableau 7), la plaque est ensuite introduite dans un thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal cycler Tc 29600 G 1002066) dont le programme est mentionné ci-dessous (Figure 21).

Tableau 7: Composition du mélange réactionnel pour les PCR standard

composants	Quantité PCR standard
Quantitect Probe PCR Master Mix	12.5 µl
Amorce Forward (0,02nmol/µl)	0.5 µl
Amorce Reverse (0,02nmol/µl)	0.5 µl
H ₂ O UTP (ultra pure)	6.5 µl
ADN à amplifier	5 µl

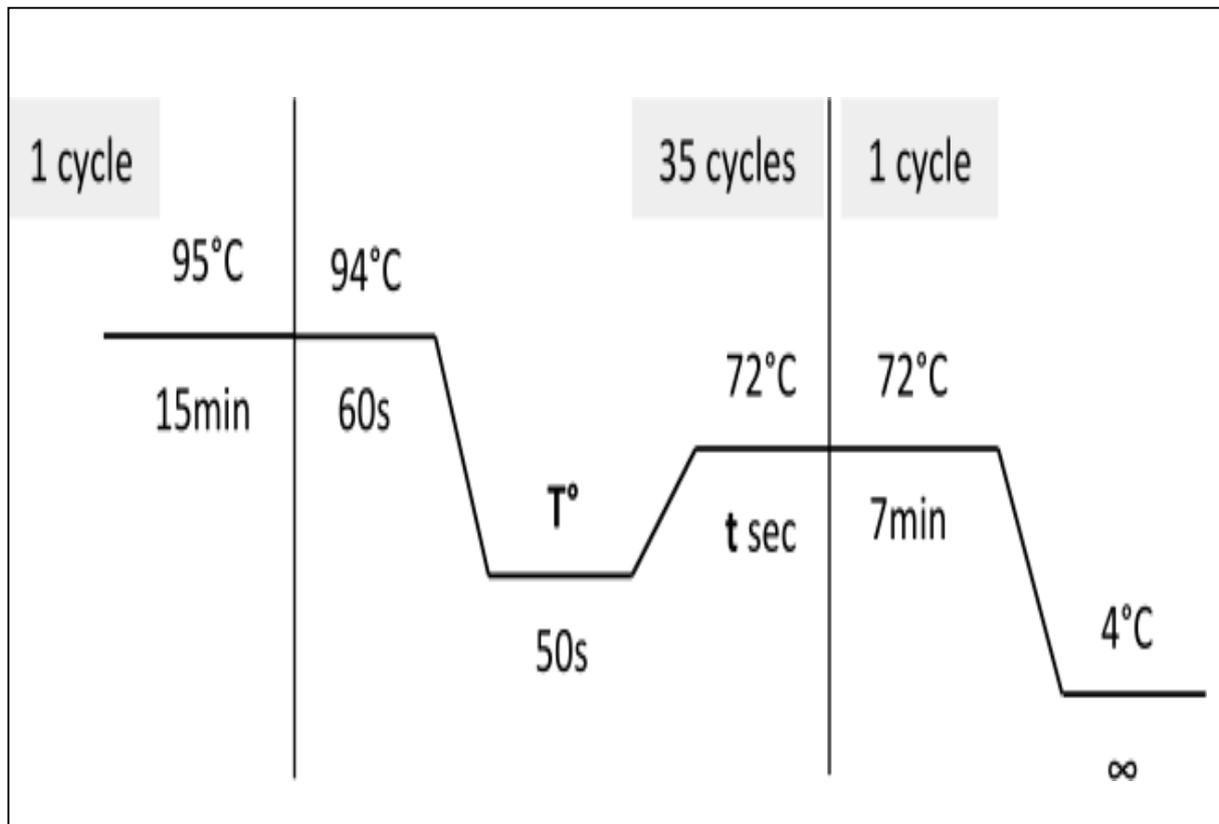


Figure 21: Programme de la PCR standard

T°: Température d'hybridation (variable selon l'amorce utilisée),

t: Temps d'élongation (variable selon la taille du fragment à amplifier).

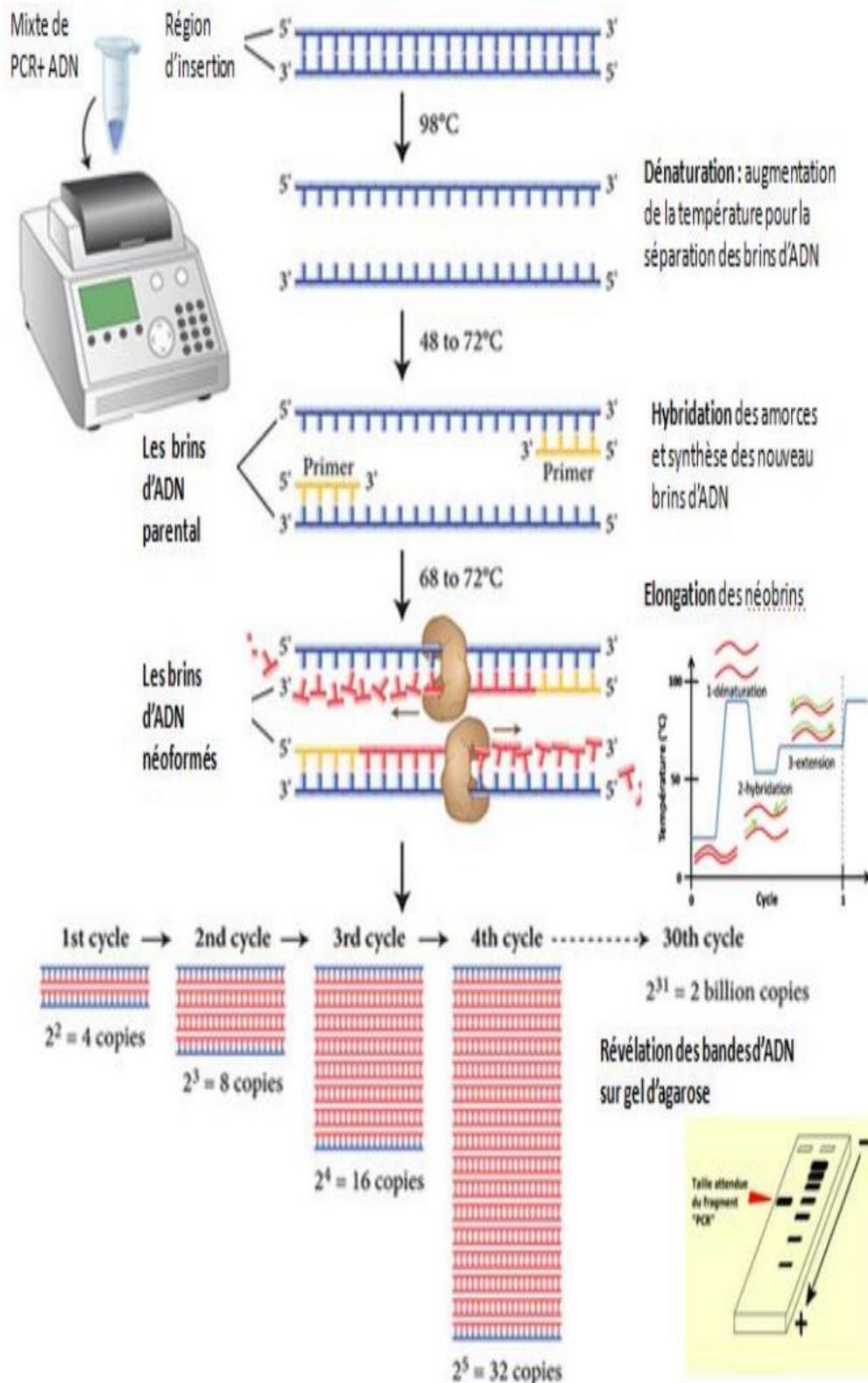


Figure 22 : Principe de la Polymerase chain reaction (PCR) standard

Tableau 8: Amorces utilisées pour les PCR standard

Gène	Contrôle positif	Référence contrôle	Amorce	Séquence 5'-----3'	Taille (bp)	Référence
Bla TEM	Kpnasey	Diene , S.M., et al., 2011	F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	861	(Kruger et al. 2004)
			R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
Bla CTX	Kpnasey	Diene , S.M., et al., 2011	F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	944	(Roschanski et al. 2014)
			R	CAGCGCTTTTGCCGTCTCCG		
Bla SHV	Kpnasey	Diene , S.M., et al., 2011	F	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	1051	Yagi, T., et al., 2014
			R	TTTATGGCGTTACCTTTGACC		
Bla OXA-48	<i>E.coli</i> CMUL64	AL- bayssari, C., et al., 2014	F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744	Poirel, L., et al., 2010
			R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		
blaKPC	Kpnasey	Diene, S.M., et al. , 2011	F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	J.M. ROLAIN Laboratoire
			R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		

10.4 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification de toutes les PCR standards décrites précédemment sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%.

➤ Protocole de préparation du gel d'agarose

Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, 6 g de poudre d'agarose sont mélangés avec 40 ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X. Le mélange est ensuite fondu au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un liquide parfaitement transparent. Une fois refroidi, une solution de bromure d'éthidium BET (3 fois (31.5 µl pour 50 ml)) est ajoutée. Le mélange est ensuite coulé dans le support du gel après avoir mis les peignes et refroidi jusqu'à la solidification.

➤ **Electrophorèse des produits d'amplification**

Après polymérisation du gel, les peignes sont retirés et le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse. La cuve d'électrophorèse est ensuite remplie avec le tampon TBE 0,5X et 4µl d'ADN marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco- BRL, 15 628-019)] sont déposés dans le premier puit. Par la suite, 4 µl du produit PCR sont mélangés avec une goutte du Blue Juice et déposés avec un témoin négatif et un témoin positif. Finalement, le couvercle de la cuve est fermé et la cuve est branchée au générateur sous une tension de 135V pour une durée de migration d'environ 30 min. Une fois la migration finie, le gel est placé dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

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

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

10.5 Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée (Sanger *et al.*, 1977), en utilisant le kit Big Dye Terminator® V1, un kit de séquençage de cycle (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et le séquenceur Automate ABI PRISM 3130 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 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 obtenus est déterminée à l'aide d'un séquenceur de leurs tailles comme une électrophorèse classique, mais il présente l'avantage d'être couplé de succession des acides nucléiques marqués ce qui 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 9 . Les produits de cette réaction sont ensuite purifiés en utilisant du séphadex. Cette méthode est basée sur la purification par chromatographie d'exclusion pour piéger des ddNTP libres en excès qui sont de bas poids moléculaire sur une colonne Sephadex. Les produits purifiés sont séquencés en utilisant le séquenceur Automate ABI 3130.

Les séquences sont ensuite analysées avec le logiciel Codon Code Aligner. La séquence ainsi corrigée est comparée avec celle des séquences existantes dans la base de données GenBank en

utilisant le programme BLAST (BlastN) disponible au Centre National d'Information en Biotechnologie (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et la base de données ARG-ANNOT (résistance aux antibiotiques Gene-annotation) qui est un nouvel outil bio-informatique créé afin de détecter de nouvelles résistances aux antibiotiques des gènes existants et putatifs dans les génomes bactériens (S. K. Gupta *et al.* 2014).

10.5.1 Purification

Après électrophorèse, la présence des bandes d'ADN est vérifiée par le système d'imagerie à UV. Ensuite, 100 µl d'eau ultra pure sont ajoutés au produit PCR, puis le tout est transféré dans une plaque à filtre pour faire la première purification. Par la suite, cette plaque à filtre est déposée sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Enfin, 50 µl d'eau ultra pure sont ajoutés et le mélange est agité pendant 20 min sur un agitateur. Le produit est purifié et prêt pour la PCR Big Dye.

10.5.2 PCR BigDay

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR Big Dye consiste à mettre, dans chaque puit de la plaque de thermocycleur Bio-rad, 20 µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 9). L'amplification BigDye a été réalisée dans un thermocycleur (MultiGene™ OptiMax, Labnet International, Inc) selon le programme décrit dans la figure 23.

Tableau 9: Composition du mélange réactionnel pour la PCR BigDye

Composants	Quantité PCR BigDye
Buffer	3 µl
Mix BigDay	2 µl
Amorce (Forward ou le Reverse)	1 µl
H₂O UTP	10µl
ADN à amplifier	4 µl

ADN à amplifier = produit de la PCR standard purifié.

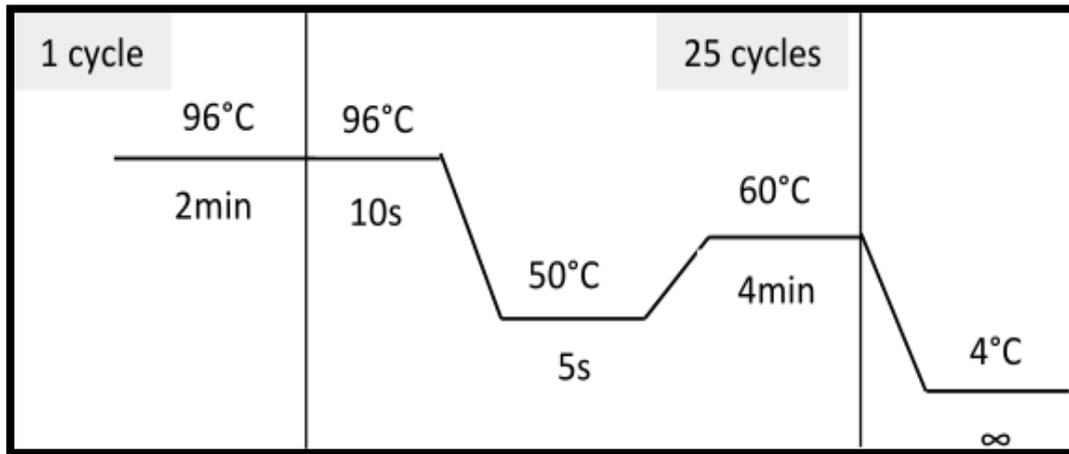


Figure 23: Programme de la PCR BigDye pour le séquençage

10.5.3 Purification par Sephadex

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex G 50 (Sigma), la poudre de Sephadex est mise dans les puits de la plaque et 300 µl d'eau ultra pure y sont ajoutés, la plaque est ensuite laissée 2 à 3 heures à température ambiante. Après avoir mis la plaque à filtre au-dessous d'une plaque contenant des puits, une centrifugation à 12000 rpm est réalisée pendant 10 min à 10°C pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté. Les produits PCR Big Dye sont par la suite ajoutés dans la plaque à filtre qui sera placée sur une deuxième plaque à puits pour collecter après centrifugation (à 12000 rpm pendant 10 min à 10°C) les produits PCR purifiés. Cette plaque est ensuite recouverte par un tapis de protection. Le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

10.5.4 Séquençage

Sur le séquenceur automatique ABI PRISM 3130, les fiches sont remplies sur le logiciel approprié. Par la suite la plaque est mise sur le support adéquat et le séquençage est lancé une fois la plaque est déposée dans le séquenceur.

10.5.5 Analyse des séquences

Les séquences brutes obtenues par le séquençage sont analysées et corrigées par le logiciel codon code Aligner. Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) pour la comparaison avec les séquences homologues contenues dans GenBank. Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches (Altschul 1997).

10.6 Typage des isolats

10.6.1 Biotypage par MALDI-TOF-MS

Utilisée en routine pour l'identification des espèces ou des sous espèces au sein du même genre. La technique MALDI-TOF-MS est aussi utilisée pour la détermination de la clonalité des souches. Le typage par cette technique a prouvé sa puissance par différentes études épidémiologiques. Le *screening* des protéines ribosomales est présenté sous forme de spectres constitués de différents pics, le typage des souches par ces spectres a été réalisé avec la combinaison de deux Bruker softwares, le Flex analysis (Bruker Daltonics), qui sélectionne les spectres correctes > 1000DA, et le Biotyper Bruker 3.0 (Bruker Daltonics) qui sert au téléchargement des spectres, et à la projection du spectre principale MSP (Main Spectra) pour chaque souche des BGN . Par la suite, les MSP dendrogrammes ont été construits en utilisant le MALDI Biotyper 3.0. Le MSP dendrogramme est divisé en clusters, ces derniers sont analysés selon le niveau de distance arbitraire.

10.6.2 Génotypage par la méthode "Multi-locus séquence typing" (MLST)

MLST est basé sur le séquençage de 7 gènes de ménage (housekeeping genes) importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques à chaque espèce. L'alignement des séquences d'un locus donné, permet de repérer les allèles différents entre eux, par des mutations et/ou recombinaisons pour chaque souche bactériennes. La combinaison des numéros correspondant aux allèles des 7 locus étudiés définit un profil allélique ou «Séquence Type» (ST). Pour la détermination du profil allélique, l'ordre d'affectation des numéros aux 7 locus a été fixé arbitrairement. La numérotation des profils alléliques a également été établie par ordre d'identification de ceux-ci (ST-1, ST-2, etc.). La base des données référençant les profils alléliques déposés et les protocoles sont accessible en ligne (<http://pubmlst.org> et <http://pasteur.fr/mlst/>). Note : le génotypage a été réalisé seulement sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes. (Diancourt *et al.* 2005).

Tableau 10: Amorces pour les PCR du typage moléculaire chez *K. pneumoniae*

Gène	Amorce	Séquence (5'3')	Taille (bp)
<i>rpoB</i>	rpoB-F	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	501
	rpoB-R	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
<i>gapA</i>	gapA-F	TGAAATATGACTCCACTCACGG	450
	gapA-R	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	
<i>mdh</i>	Mdh-F	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	477
	Mdh-R	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i>	Pgi-F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	432
	Pgi-R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	phoE-F	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	420
	phoE-R	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	infB-F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	318
	infB-R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	tonB-F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	414
Gènes de Seq	F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA	-
	R	TT--GTGAGCGGATAACAATTTC	

11. Transfert par conjugaison

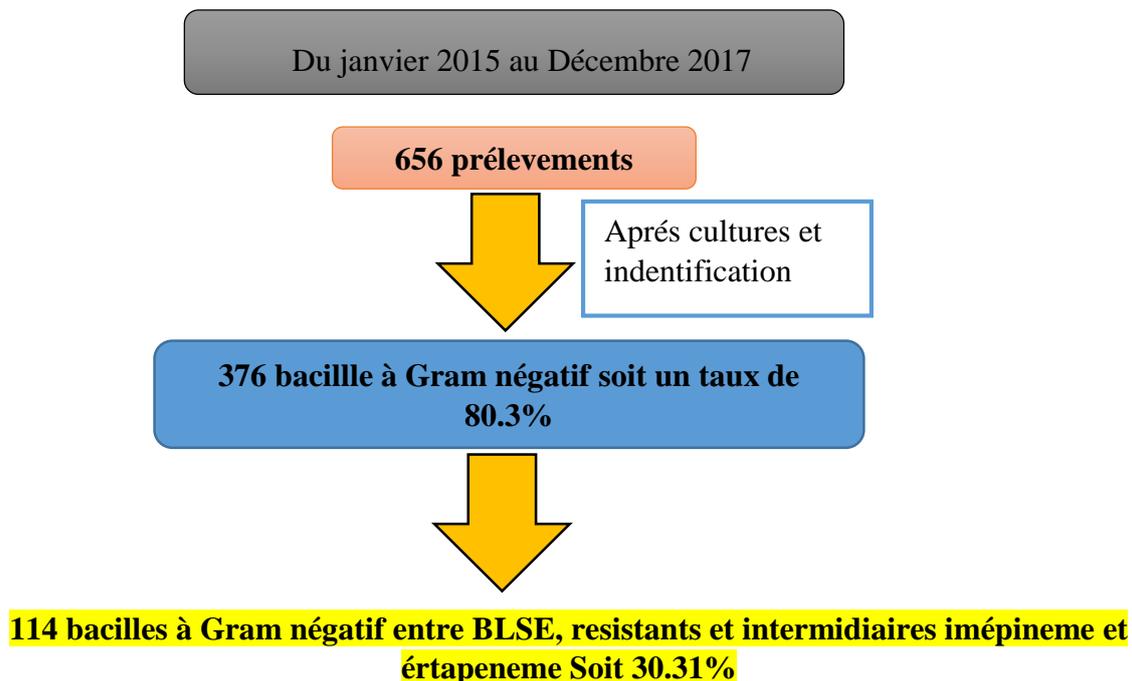
Les souches donatrices et la souche réceptrice *E. coli* J53, résistante à l'azide de sodium, ont été mises en culture séparément dans 10 ml de bouillon Luria-Bertani (LB) pendant 18h à 37°C sous agitation. Puis, une dilution au 1/50ème dans 10ml de bouillon LB neuf a été effectué pour chaque souche donatrice et pour la souche réceptrice et incubée pendant 4 heures à 37 ° C sous agitation. Ensuite, un mélange de 1 ml de chaque souche donatrice et de 4 ml de la souche réceptrice a été incubé pendant 2 heures à 37°C sans agitation. Les transconjugants ont été sélectionnés sur géloses LB additionnées de 200 mg/L d'azide de sodium et soit de 0,5 mg/L d'ertapénème. Enfin, les transconjugants obtenus ont fait l'objet de contrôle de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion (antibiogramme standard) et par des réactions de PCR pour détecter les gènes de résistance d'intérêt.

12. Transformation

La transformation a été utilisée lorsque le transfert par conjugaison a échoué. L'électroporation a été réalisée comme suit : après extraction de l'ADN plasmidique, à l'aide d'un kit d'extraction « High Purity Plasmid Miniprep (Neobiotec, Los Angeles, CA) » selon les recommandations du fabricant, 1 µl de préparation de plasmides purifiés a été additionné à 20 µl de cellules électrocompétentes d'*E. coli* DH10B (ElectroMAX Invitrogen). Ce mélange a été transféré dans la cuvette prête à l'emploi de 0,2 de largeur. Les conditions d'électroporation ont été comme suit : 1,8 kV, 200 Ω, 25 µF (Gene Pulser™, Biorad, Marnes-la-coquette, France). Ce mélange a été repris dans 250 µl de la solution SOC (Annexe 4) dans un tube Falcon et incubé à 37°C pendant 3 heures sous une faible agitation. Les transformants sont ensuite sélectionnés sur des géloses LB contenant 0,5 mg/L d'ertapénème pour les souches productrices de carbapénèmases.

Résultats

1- Présentation des prélèvements :



2. Description de la population

Durant l'échantillonnage réalisé de janvier 2015 à décembre 2017, un total de 376 bacilles à Gram négatif ont été isolés au niveau du laboratoire de microbiologie de CHU Ibn Rochd d'Annaba, et ce à partir de différents prélèvements cliniques provenant des patients hospitalisés dans le service d'urologie du CHU d'Annaba.

Nous avons pu sélectionner parmi celles-ci, 114 souches BGN (30.31%) qui ont présentées des résistances remarquables (BLSE et IMP-I/R ou ERT-R) soit : 83 entérobactéries et 31 bacilles à Gram négatif non fermentants.

Notre étude moléculaire s'est concentrée exclusivement sur 14 souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase.

3. Aspects bactériologique des infections nosocomiales dans le service d’urologie :

3.1 Fréquence des prélèvements reçus en fonction de leur positivité :

Tableau 11: Fréquence des prélèvements en fonction de leur positivité

	Nombre	Pourcentage %
prélv+	468	71,30%
prélv-	188	28,70%

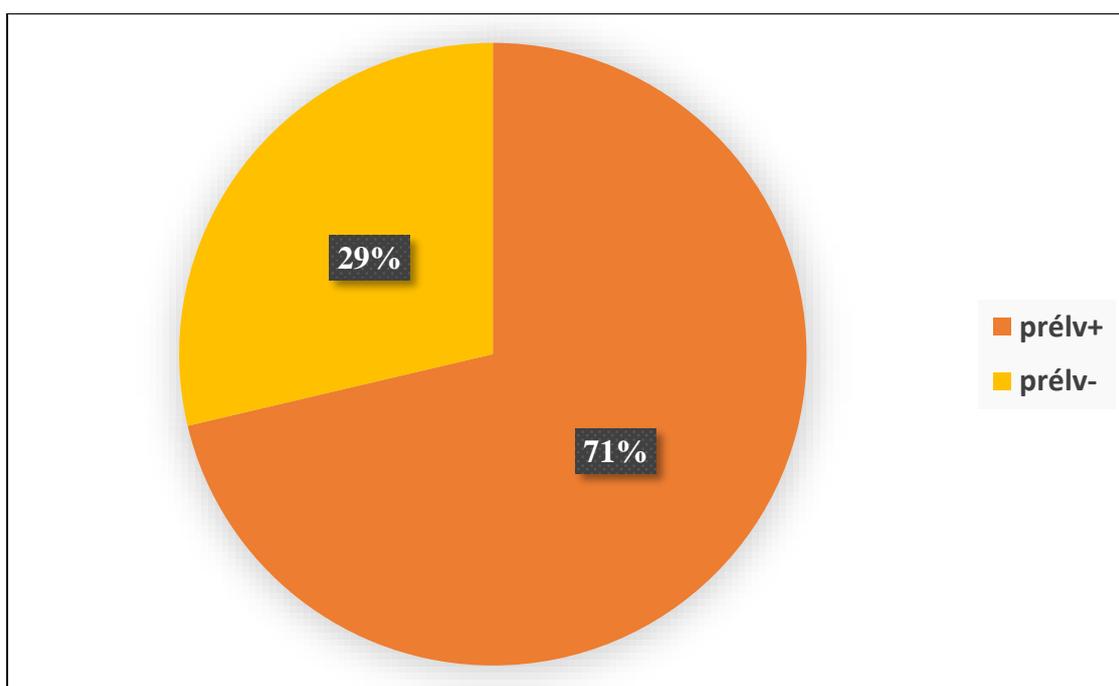


Figure 24: Fréquence des prélèvements en fonction de leur positivité

Parmi les **656 prélèvements** reçus du service d’urologie, **468** se sont révélés positifs, avec un pourcentage de 71%, alors que 29% sont négatifs.

3. 2 Répartition des infections en fonction du type du prélèvement :

Tableau 12: Répartition des prélèvements positifs en fonction du type de prélèvement

Type de prélèvement	Nombre	Pourcentage %
Urine de sonde jj	197	42.09
Pus	118	25.21
ECBU	93	19.87
Liquide pleurale	10	2.13
PV	20	4.27
Liquide d'hydrocèle	5	1.06
Hémoculture	10	2.13
Kyste rénale	6	1.28
Néphrostomie	5	1.06
LCR	4	0.85
Total	468	100

PV : prélèvement vaginale, LCR : liquide céphalo-rachidien

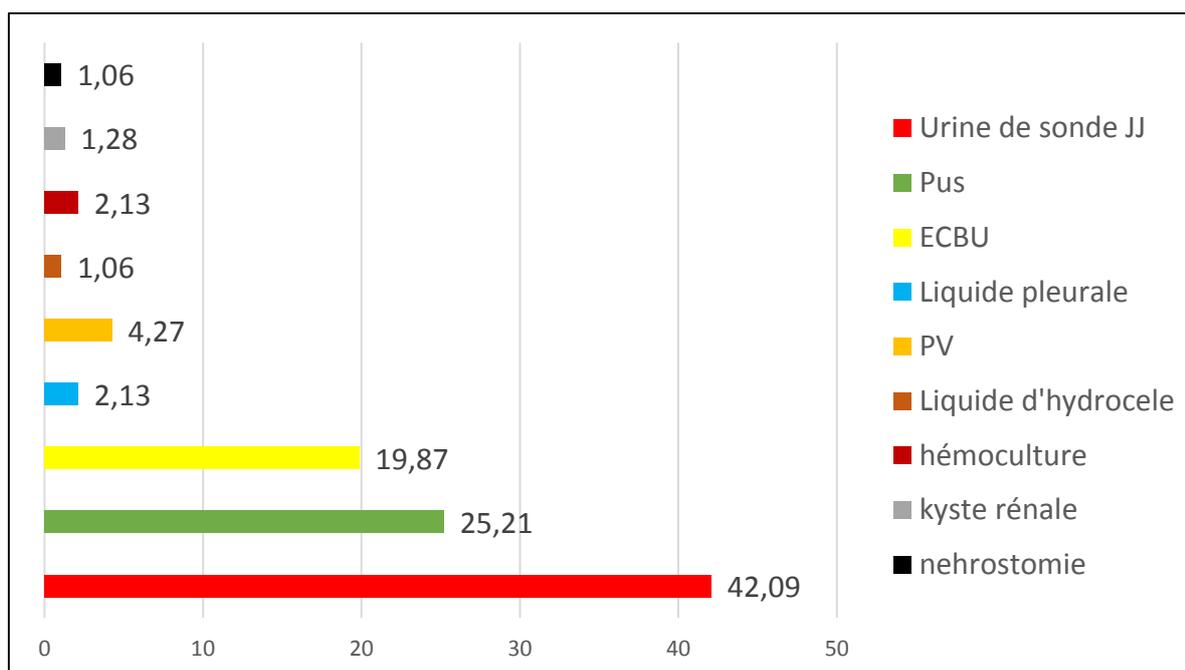


Figure 25: Répartition des prélèvements positifs en fonction du type de prélèvement

Sur les **468 prélèvements positifs** ; les prélèvements **des urines de sonde jj** représentaient 42.09% des cas positifs, suivis par les prélèvements de **pus et les urines** dans 25.21% et 19.87% des cas respectivement.

3. 3 Répartition des bactéries incriminées selon leurs catégories de germe :

Tableau 13: Répartition des prélèvements positifs en fonction de la catégorie de germe

	Nombre	%
bacille gram-	376	80,30%
cocci gram+	92	19,70%

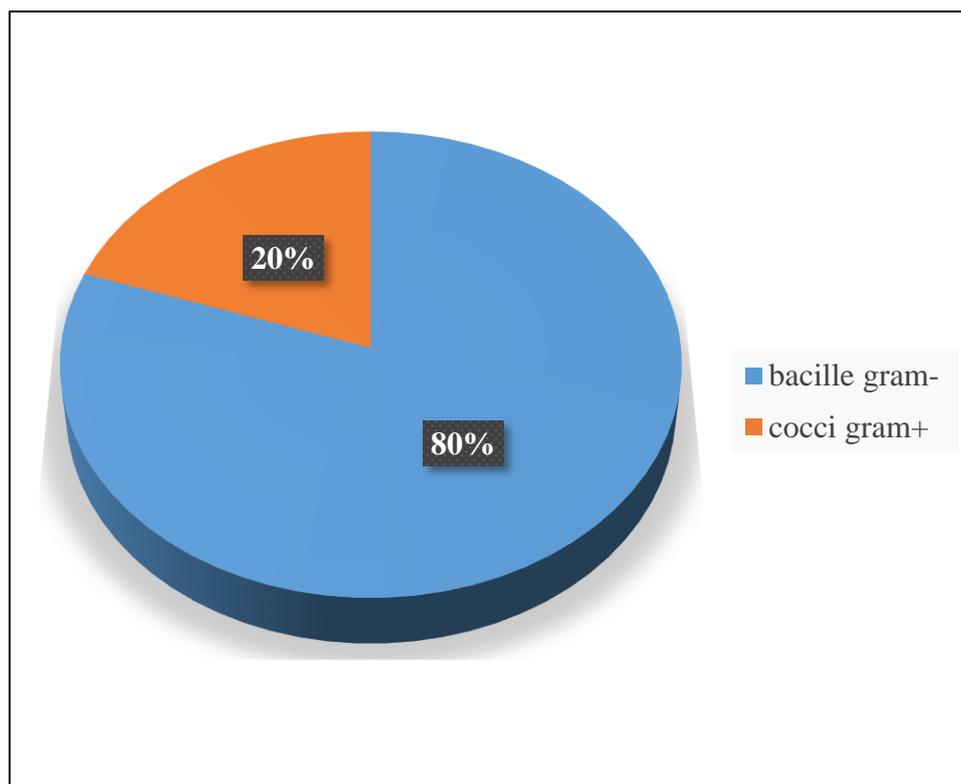


Figure 26: Répartition des prélèvements positifs en fonction de la catégorie de germe

Parmi les **468 bactéries** isolées des patients hospitalisés en urologie, les bacilles à Gram négatif prédominent avec un pourcentage de l'ordre de 80 %, contre un pourcentage de 20% représenté par les cocci à Gram positif.

3. 4 Fréquence des espèces bactériennes incriminées :

Tableau 14: Nombre et pourcentage des espèces bactériennes diagnostiquées en urologie

Espèce bactérienne	Nombre	Pourcentage%
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	100	21,4
<i>Escherichia coli</i>	96	20,5
<i>Proteus vulgaris</i>	14	2,99
<i>Proteus mirabilis</i>	9	1,92
<i>Providenciarettegrii</i>	7	1,49
<i>Enterobactercloacae</i>	24	5,12
<i>Morganellamorganii</i>	20	4,27
<i>Serratiamarcescens</i>	1	0,21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	7,05
<i>Acinetobacter baumannii</i>	72	15,38
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	7,47
<i>Staphylococcus a coagulase-</i>	19	4,05
<i>Streptococcus. spp</i>	2	0,42
<i>Enterococcus.spp</i>	36	7,69
Total	468	100

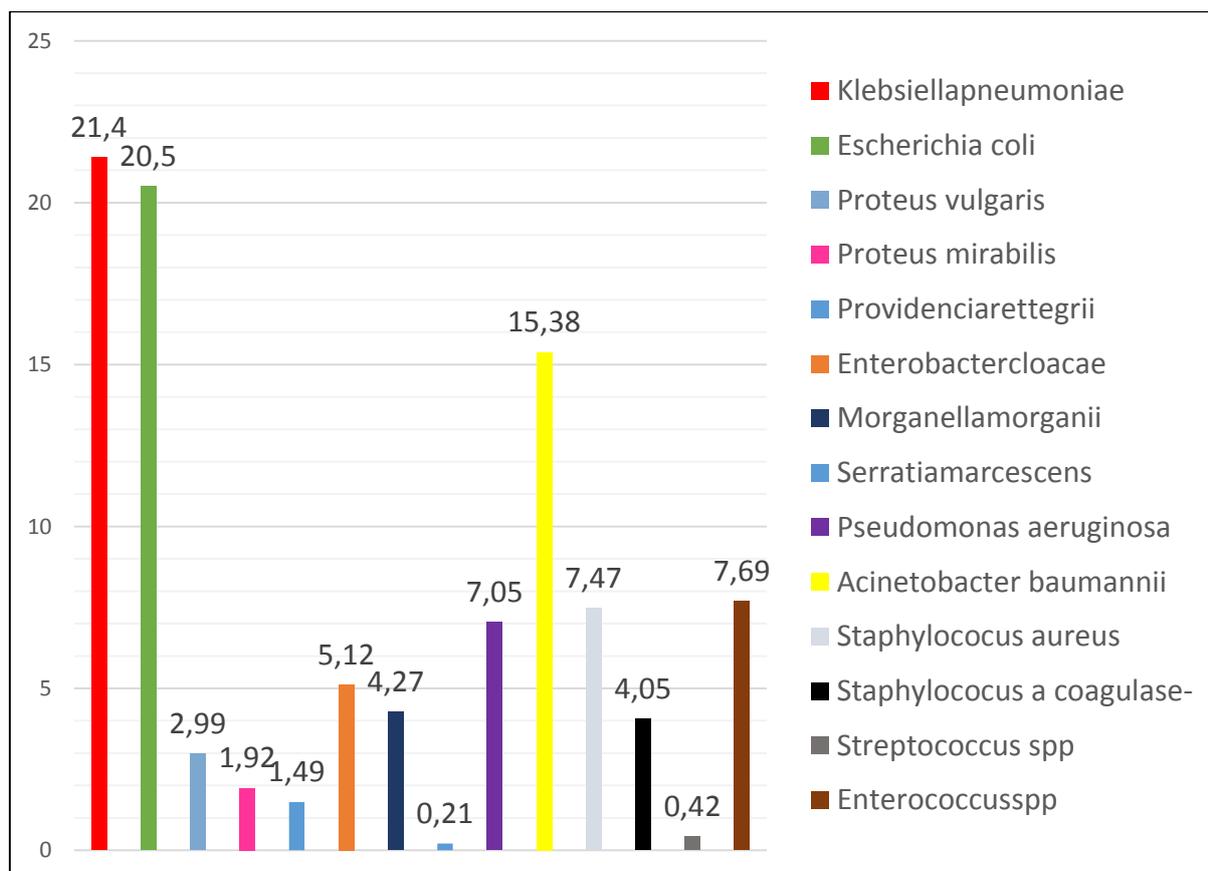


Figure 27: Pourcentage des espèces bactériennes diagnostiquées en urologie

Parmi toutes ces espèces bactériennes, *Klebsiella pneumoniae* a été incriminée dans la plupart des cas soit une fréquence de l'ordre de 21.4%, suivie directement par *Escherichia coli* et *Acinetobacter baumannii* dans 20.5% et 15.38% respectivement.

4. Identification des souches bactériennes

4.1 Identification différentielle

L'identification des 114 souches de bacilles à Gram négatif a été déterminée par API20NE ou API20E (système d'identification) à l'aide d'une feuille de calcul du logiciel Excel ensuite par le MALDI-TOF MS elle a donné de très bons scores d'identification confirmant l'identification par le système API et permet de diviser les 114 BGN en deux grands groupes : entérobactéries 83 (73%), et 31 (27%) aux groupes des bacilles à Gram négatif non fermentants. (Figure 28)

Tableau 15: répartition des souches isolées

	Nombre	Pourcentage %
Enterobacteries	83	73
BGN-NF	31	27

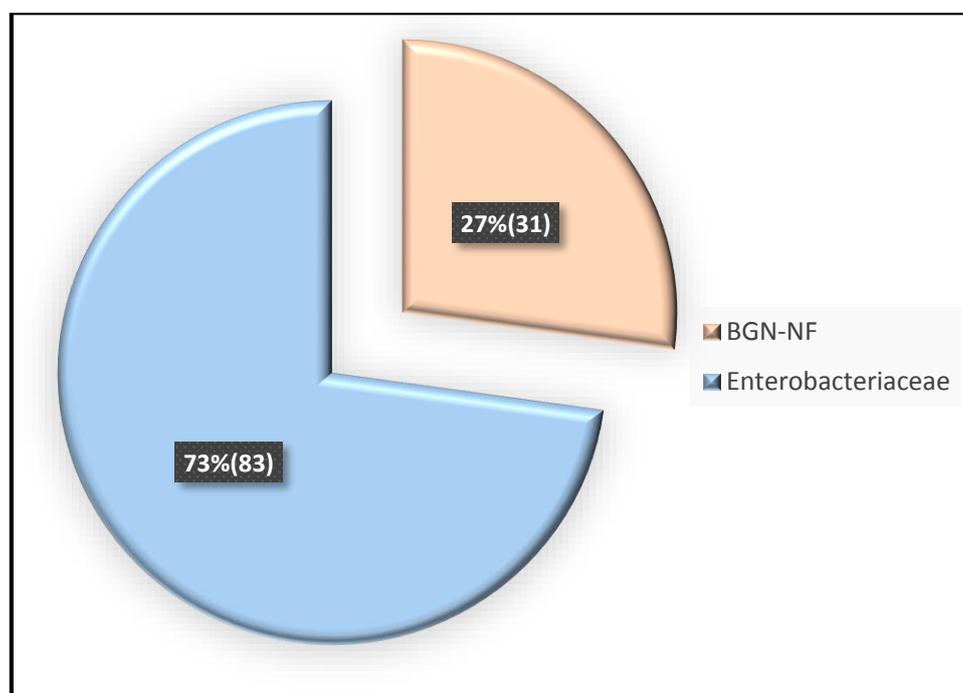


Figure 28: répartition des souches isolées

4.2 Identification biochimique

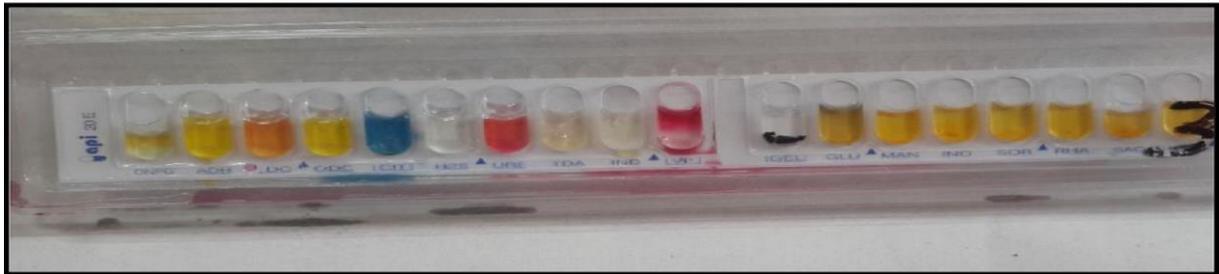


Figure 29: Exemple d'identification bactérienne obtenue de *K.pneumoniae* par les Api systèmes

L'identification des 114 souches effectuée au premier temps par les Api système (Api 20 E, Api 20 NE. bioMérieux, Meylan, France), a répondu aux profils numériques spécifiques de chaque espèce isolée.

- ✓ Api 20 E (Entérobactéries) : *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae* ; *M.morganii* ;
- ✓ Api 20 NE (Non-Fermentants) : *A. baumannii* et *P. aeruginosa* ;

4.3 Identification par MALDI-TOF-MS

Finalement, la spectrométrie de masse MALDI TOF-MS, a confirmé l'identification de toutes les souches dont 95% ont donné les même résultats que les Api systèmes. Les résultats d'identification des bactéries ont présenté de bon score allant de 1.9 à 2.327.

5. Répartition des souches bactériennes

5.1 Répartition des souches selon l'espèce :

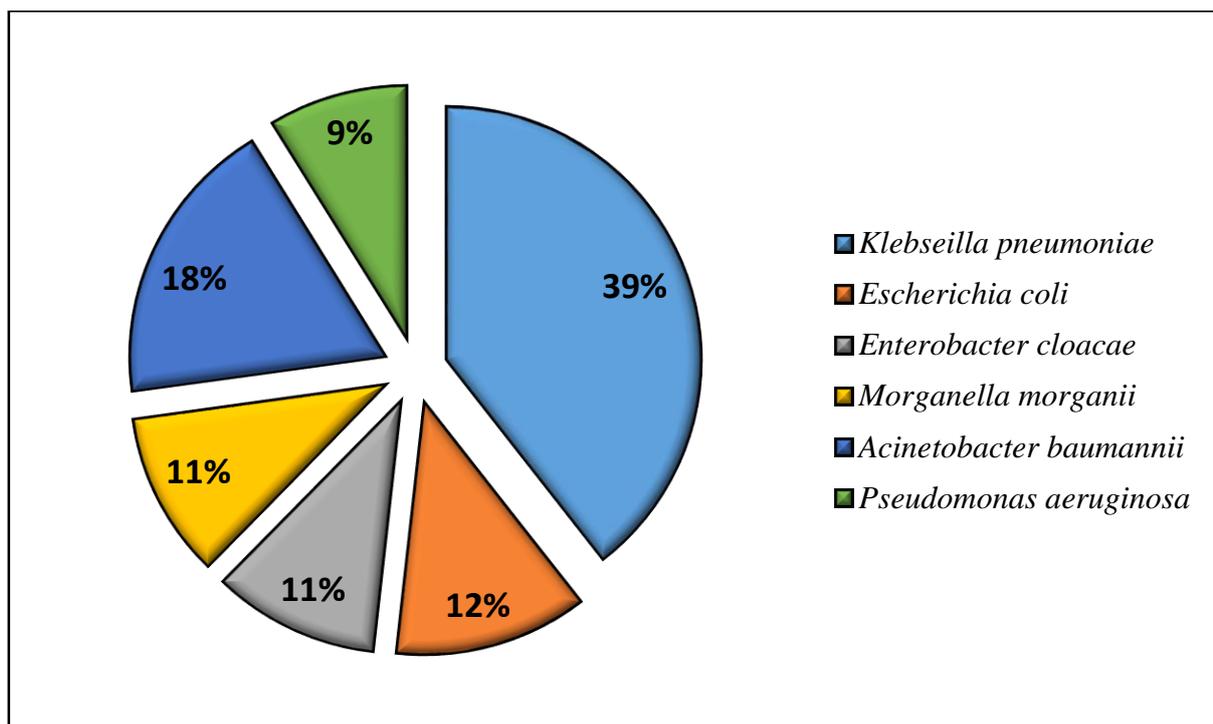


Figure 30: Répartition des bacilles à Gram négatif selon les espèces

Parmi les 83 souches des entérobactéries, la dominance a été attribuée à *Klebsiella pneumoniae*. N= 45 (39%) (Tableau 26), suivie par *Escherichia coli* N= 14 (12%) (Tableau 27), *Enterobacter cloacae* N=12 (11%) (Tableau28), *Morganella morganii* N=12 (11%) (Tableau 29) et 31 bacilles à Gram négatif non fermentants : 21(18%) *A. baumannii* (Tableau19) et 10 (09%) *P. aeruginosa* (Tableau20) (Figure 30).

5.2 Répartition des souches selon le sexe :

Tableau 16: Répartition des souches selon le sexe

sexe	Nombre	Pourcentage %
Masculin	68	60
Féminin	46	40

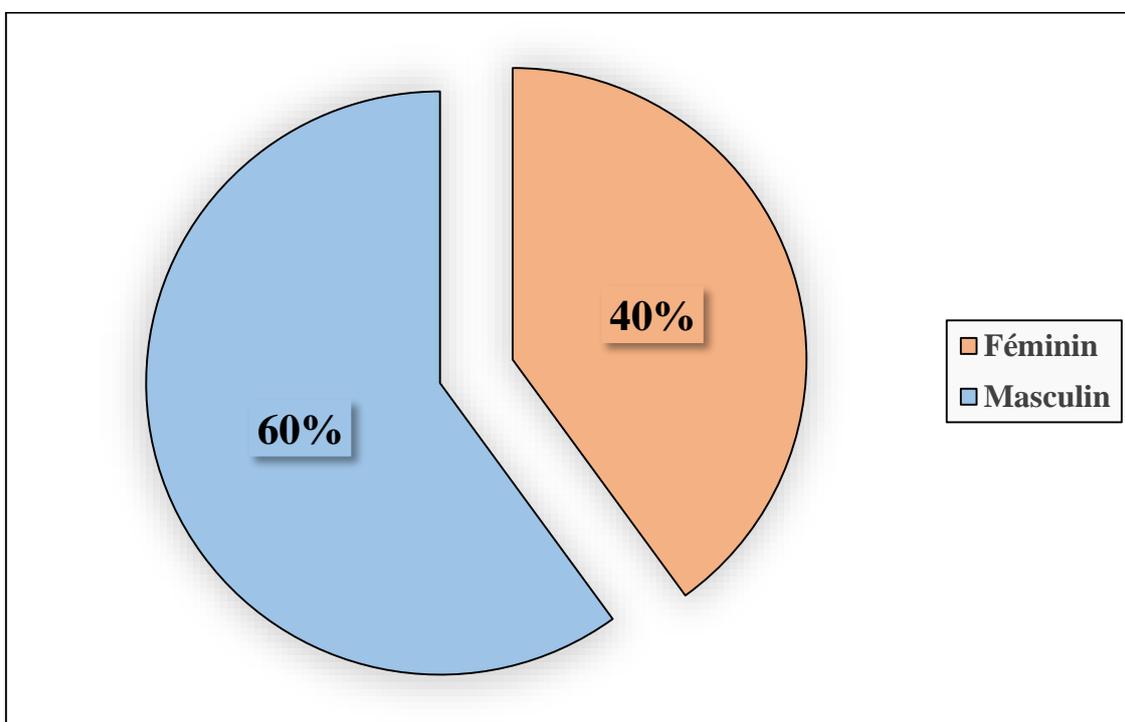


Figure 31: Répartition des espèces selon le sexe

La population de laquelle nous avons isolé nos souches est caractérisée par un pourcentage de 60 % (68/114) des prélèvements qui sont issus de patients du sexe masculin contre 40% (46/114) chez le sexe féminin. Cette répartition est illustrée par la figure 31

5.3 Répartition des souches selon l'âge :

Tableau 17: Répartition des souches selon l'âge

Age	Nombre	Pourcentage %
19-40 ans	26	24
40-60 ans	52	48
>60 ans	36	28

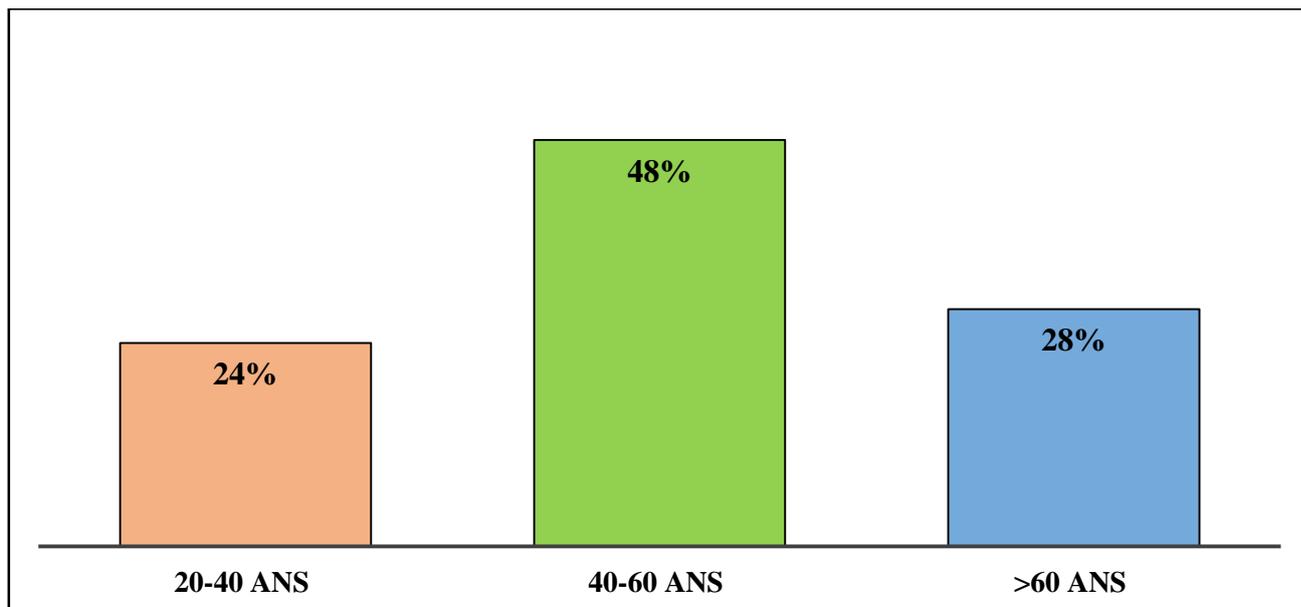


Figure 32: Répartition des espèces selon l'âge

Toutes les tranches d'âges sont touchées par les infections à BGN, avec des extrêmes d'âge variant entre 19 ans et 83 ans. La tranche d'âge qui semble la plus touchée dans notre étude est la population des personnes âgées (40-60 ans : 48%), suivie par la population de (>60 ans : 28%) (Figure 32).

5.4 Répartition des souches selon la nature de prélèvement :

Tableau 18: Répartition des souches selon la nature de prélèvement

Type de prélèvement	Nombre	Pourcentage %
Pus	40	35%
Sonde JJ	51	45%
Urine	19	17%
Drain nephrostomie	3	2%
Drain kystique	1	1%

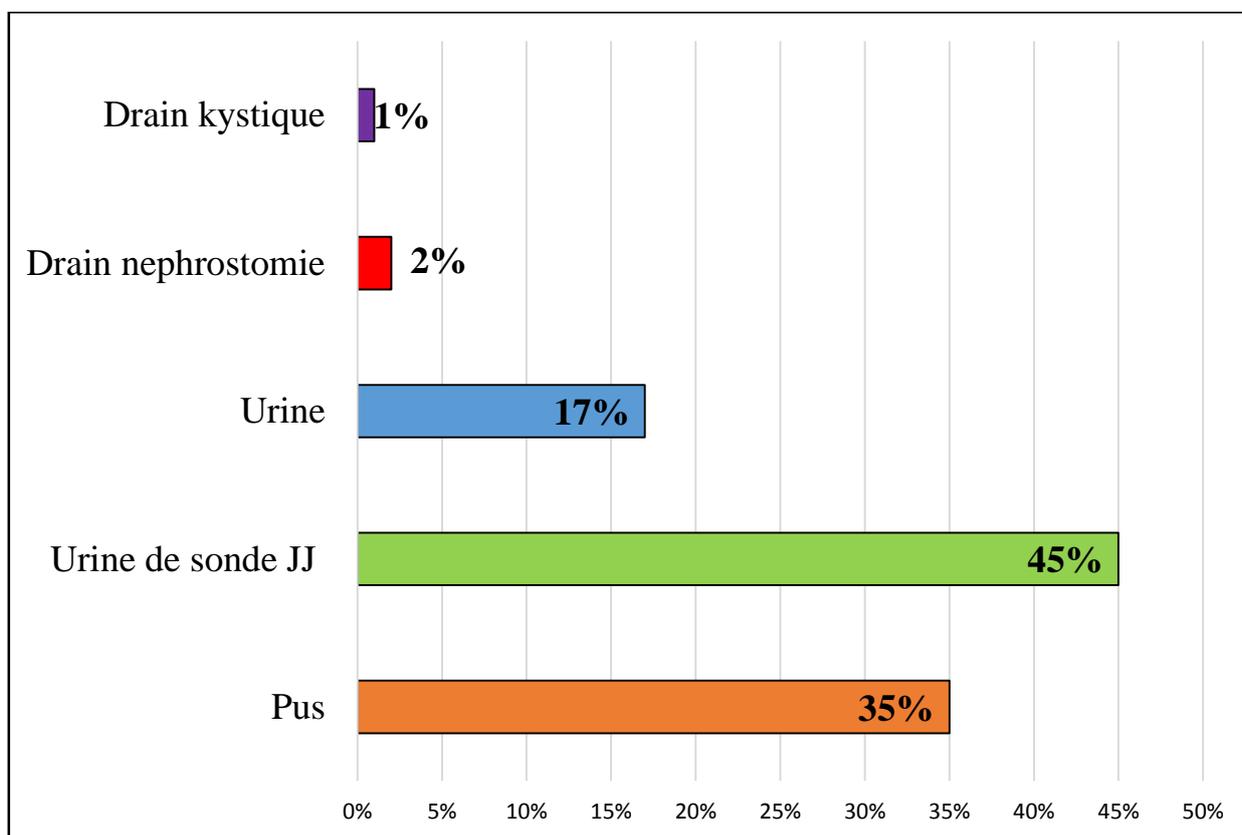


Figure 33: Répartition des souches par nature de prélèvements

Nous avons noté que parmi les 114 BGN que les urines de sonde double J constitue le spécimen le plus répandu 45% suivie par le Pus 35% , les urines 17%, drain néphrotomie 2% et 1% pour le drain kystique. (Figure33)

6. Bacilles à Gram négatif non fermentaires

La première partie de notre étude a porté sur 31 bacilles à Gram négatif non fermentaires, dont 21 *Acinetobacter baumannii* et 10 *Pseudomonas aeruginosa*.

6.1 Origine et identification des souches isolées

L'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF-MS (Microflex) des 21 souches d'*A. baumannii* et de 10 *Pseudomonas aeruginosa* dont les scores varient de 1.9 à 2.3 confirme l'identification réalisée par la galerie API20-NE (BioMérieux, Meylan, France) (Tableaux19,20), (Figure34).

Sample	Score 1	Score 2
(+++)(A)		
F5 (+++)(A)	2.534	2.522
F6 (+++)(A)	2.516	2.349
F7 (++)(A)	2.284	2.16
F8 (++)(A)	2.287	2.062
F9 (+++)(A)	2.44	2.419
F10 (+++)(A)	2.451	2.195
F11 (+++)(A)	2.347	2.308
F12 (+++)(A)	2.413	2.313
G1 (++)(A)	2.182	2.114
G2 (+++)(A)	2.34	2.119
G3 (+++)(A)	2.477	2.476
G4 (++)(A)	1.919	1.73
G5 (+++)(A)	2.509	2.509

Figure 34: Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF

Tableau 19: Caractérisation des souches d'*A. baumannii* en fonction de leur score MALDI-TOF

N° souche	Date de prelevement	Nature de prelevement	Sexe	Age	Score MALDI-TOF
A01	09/02/2015	Pus	F	61	[2.10-2.23]
A02	13/02/2015	Drain nephrostomie	M	46	[1.88-2.11]
A03	16/02/2015	Pus	F	67	[1.91-2.31]
A04	17/02/2015	Urine	M	83	[2.02-2.32]
A05	17/02/2015	Urine	M	45	[2.19-2.30]
A06	29/03/2015	Urine	M	67	[1.92-2.30]
A07	05/02/2015	Pus	M	50	[2.04-2.31]
A08	14/08/2015	SondeJJ	M	22	[1.98-2.12]
A09	05/11/2015	SondeJJ	M	57	[2.25-2.35]
A10	17/02/2016	Drain nephrostomie	M	26	[1.99-2.31]
A11	21/02/2016	Pus	M	76	[1.91-2.32]
A12	25/04/2016	SondeJJ	M	61	[2.29-2.36]
A13	09/05/2016	Pus	M	80	[1.95-2.34]
A14	16/05/2016	SondeJJ	M	24	[2.05-2.31]
A15	25/05/2016	Urine	M	74	[2.22-2.30]
A16	08/02/2017	SondeJJ	F	48	[2.27-2.35]
A17	18/04/2017	SondeJJ	M	47	[1.90-2.30]
A18	26/04/2017	Pus	M	57	[2.24-2.31]
A19	21/09//2017	SondeJJ	F	32	[2.16-2.30]
A20	13/12/2017	SondeJJ	F	40	[1.90-2.30]
A21	16/05/2017	SondeJJ	M	24	[2.19-2.30]

M : Masculin, F : Féminin,

Tableau 20: Caractérisation des souches de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction de leur score MALDI-TOF

N° souche	Date de prélèvement	Nature de prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI-TOF
P01	13/03/2015	Pus	M	29	[2.02-2.22]
P02	16/06/2015	SondeJJ	M	39	[2.05-2.19]
P03	24/01/2016	SondeJJ	F	57	[2.05-2.3]
P04	25/02/2016	SondeJJ	F	60	[1.9-2.3]
P05	20/03/2016	Pus	M	36	[2-2.3]
P06	20/10/2016	Urine	M	80	[2.02-2.31]
P07	02/02/2017	SondeJJ	M	24	[2.05-2.13]
P08	06/02/2017	SondeJJ	M	56	[2.01-2.29]
P09	05/06/2017	SondeJJ	F	41	[2.05-2.31]
P10	19/09/2017	SondeJJ	M	58	[2.1-2.19]

M : Masculin, F : Féminin,

6.2 Répartition des souches bactériennes

Tableau 21: Répartition des souches bactériennes

	Masculin	%	Feminin	%
<i>P. aeruginosa</i>	07	70	03	30
<i>A.baumannii</i>	16	76	05	24

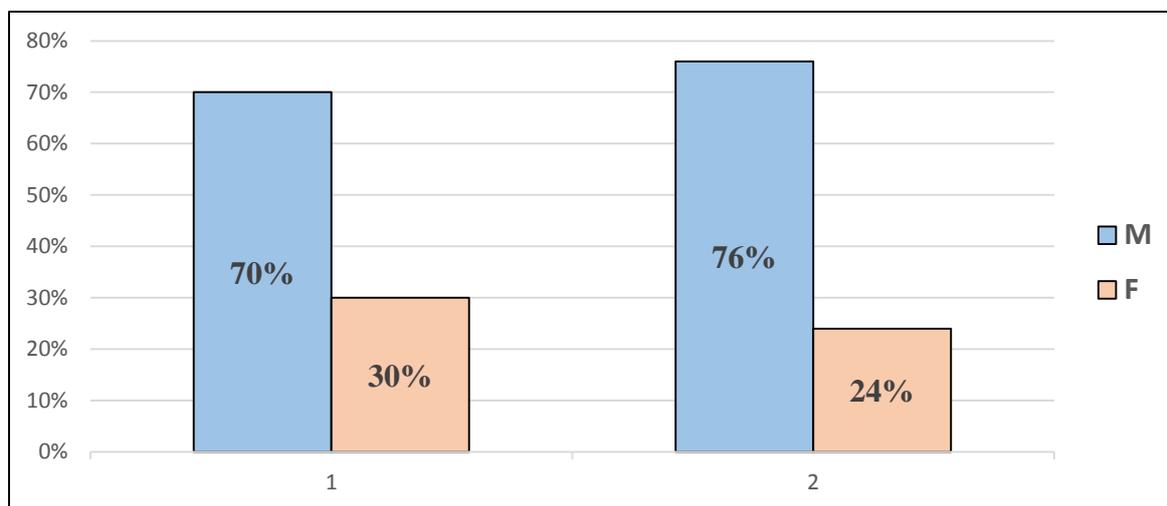


Figure 35: Répartition des patients infectés par *P. aeruginosa*(1) et *A.baumannii*(2) selon le sexe

Au total, 21 patients infectés par la bactérie *A.baumannii* sont concernés par cette étude, 16 (76%) hommes et 05(24%) femmes. Le sexe ratio est de 0.31.

Pour les souches de *P. aeruginosa*, 7 (70%) hommes et 03 (30%) femmes. Le sexe ratio est de 0.42(Figure 35).

Tableau 22: Répartition des patients infectés par *A.baumannii* et *P. aeruginosa* selon l'Age

	20-40 ans	%	40-60ans	%	>60 ans	%
<i>A.baumannii</i>	05	24	08	38	08	38
<i>P. aeruginosa</i>	04	40	05	50	01	10

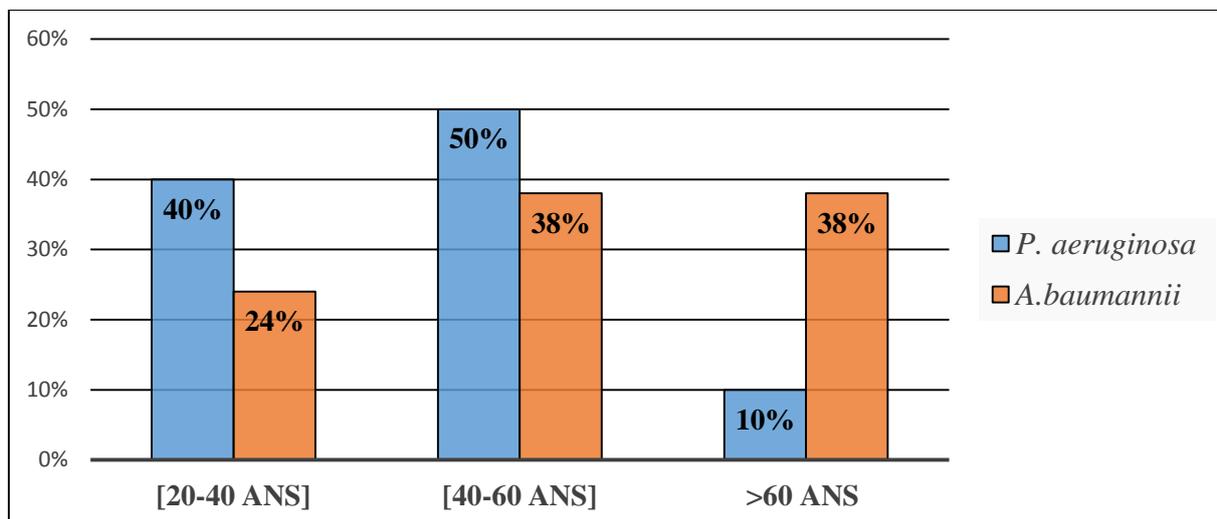


Figure 36: . Répartition des patients infectés par *A.baumannii* et *P. aeruginosa* selon l'Age

En ce qui concerne l'âge, toutes les tranches d'âge sont susceptibles aux infections nosocomiales. Dans notre étude, la catégorie la plus touchée est celle de 40 à 60 ans et plus, avec un taux de 38% pour les souches d'*A.baumannii* et 50% pour les *P. aeruginosa*. (Figure36).

Tableau 23: Répartition des patients infectés par *A.baumannii* et *P. aeruginosa* selon la période d'étude

	2015	%	2016	%	2017	%
<i>A.baumannii</i>	09	43	06	28	06	29
<i>P. aeruginosa</i>	02	33	04	34	04	34

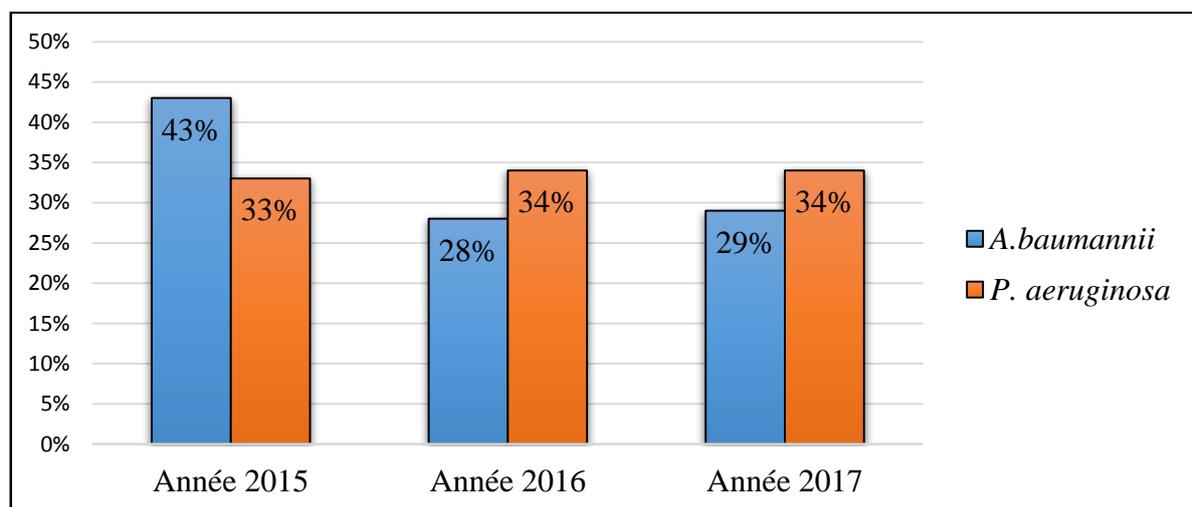


Figure 37: Répartition des patients infectés par *A.baumannii* et *P. aeruginosa* selon la période d'étude

Les souches d'*A. baumannii* et *P. aeruginosa*, ont été isolée de patients hospitalisés pendant une période de 3 ans : en 2015, 9 (43%) souches d'*A. baumannii* et 2 (33%) souches de *P. aeruginosa*. En 2016, 6 (28%) pour les *A. baumannii* et 4 (34%) pour les *P. aeruginosa*. En 2017, 6 (29%) souches d'*A. baumannii* et 4 (34%) souche de *P. aeruginosa* ont été collectées. (Figure37)

Tableau 24: Répartition des patients infectés par *A.baumannii* selon la nature de prélèvement

	Nombre	%
Urine	04	19
Pus	06	29
Urine de sonde JJ	09	43
Drain nephrostomie	02	09

Tableau 25: Répartition des patients infectés par *P. aeruginosa* selon la nature de prélèvement

	Nombre	%
Urine	01	10
Pus	02	20
Urine de sonde JJ	07	70
Drain nephrostomie	00	00

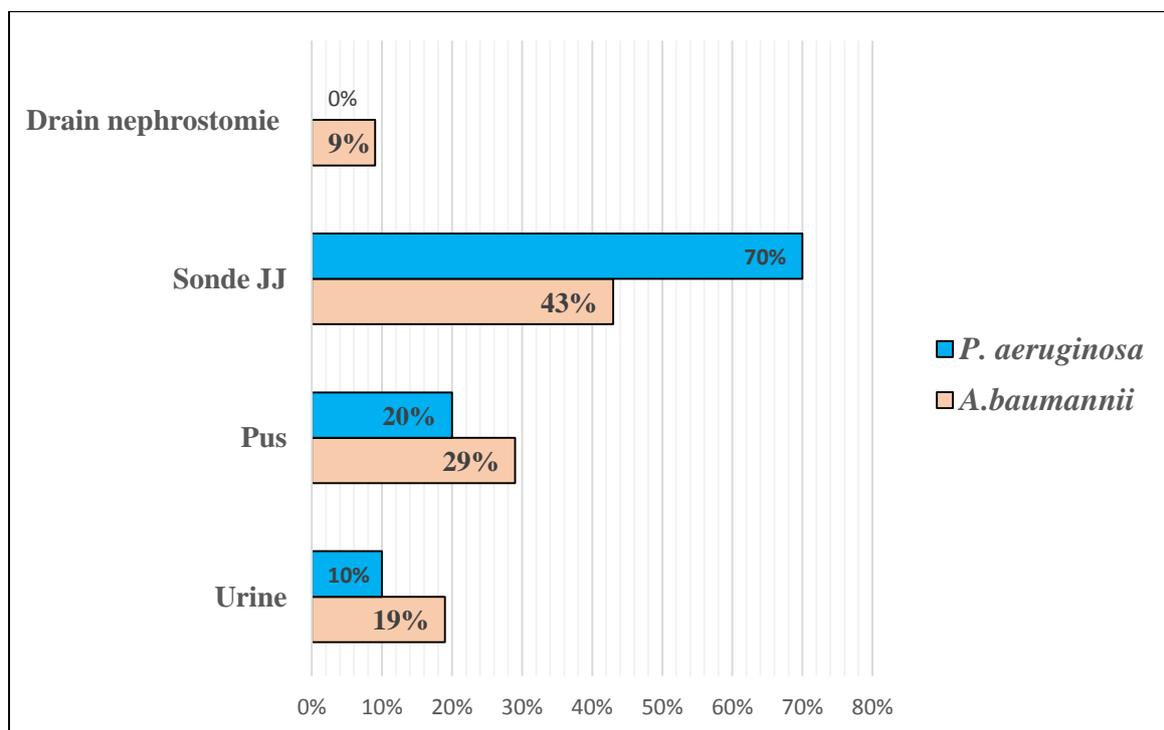


Figure 38: Répartition des patients infectés par *A.baumannii* et *P. aeruginosa* selon la nature de prélèvement

Ces souches ont été isolées à partir de divers prélèvements, principalement des urines de patients sondés 43 % (09) pour *A.baumannii* et 70%(07) pour les *P. aeruginosa* et de pus 29% (06), 20% (02) . Par ailleurs, 19%(04) des souches d'*A.baumannii* et 10% (01) de *P. aeruginosa* ont été isolées des urines de patient et 9% (02) des drains de néphrotomie. Les sondages par voie urinaire externe sont en effet fréquemment utilisés au sein de service d'urologie. Ces actes invasifs traumatisent les muqueuses ce qui facilite l'infection par les germes présents dans l'environnement inhérent du malade. (Figure38)

6.3 L'étude de la sensibilité aux antibiotiques

6.3.1 Antibiogramme par diffusion de disques sur un milieu gélosé

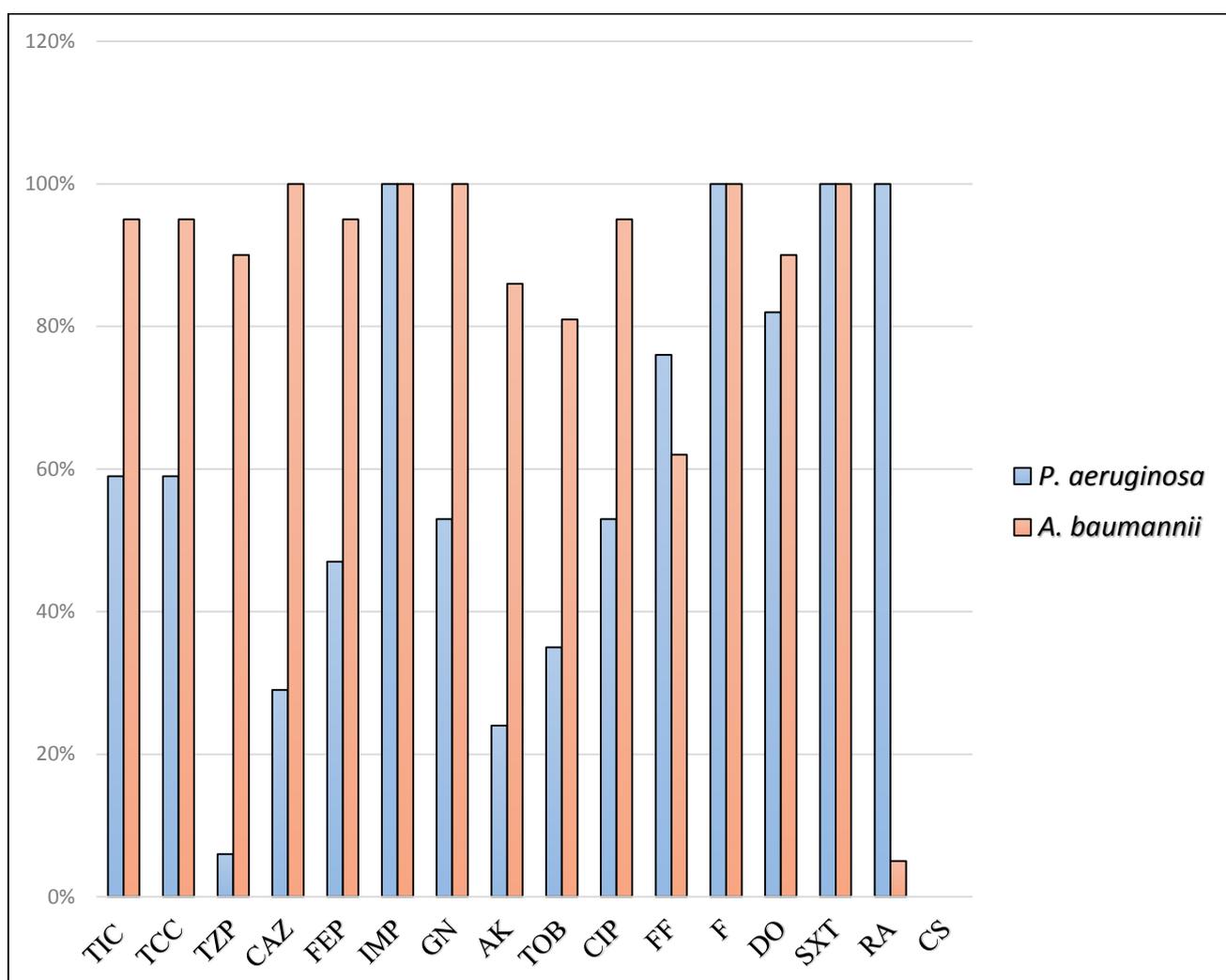


Figure 39: Profil de résistance aux antibiotiques des *A. baumannii*, *P. aeruginosa* isolées des patients hospitalisés



Figure 40: . Antibiogramme d'une souche d'*A.baumannii* (A15) et *P. aeruginosa* (P04)

La totalité des souches ont présenté des taux de résistance très élevés à la majorité des antibiotiques sauf à la colistine.

A.baumannii, a révélé une forte résistance à tous les antibiotiques, particulièrement les β -lactamines, imipénème inclus (100%). Un taux de 100% vis-à-vis de la triméthoprime/sulfaméthoxazole et gentamicine, des taux élevés aussi vis-à-vis de la ciprofloxacine, amikacine (80-90%) et résistance faible vis-à-vis la rifampicine. L'antibiogramme des *P. aeruginosa* a révélé une résistance à 100% pour l'imipénème, la rifampicine et triméthoprime/sulfaméthoxazole. Les taux restent moyens vis-à-vis des autres antibiotiques. Aucune résistance n'a été observée vis-à-vis de la Colistine. (Figure 39,40)

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

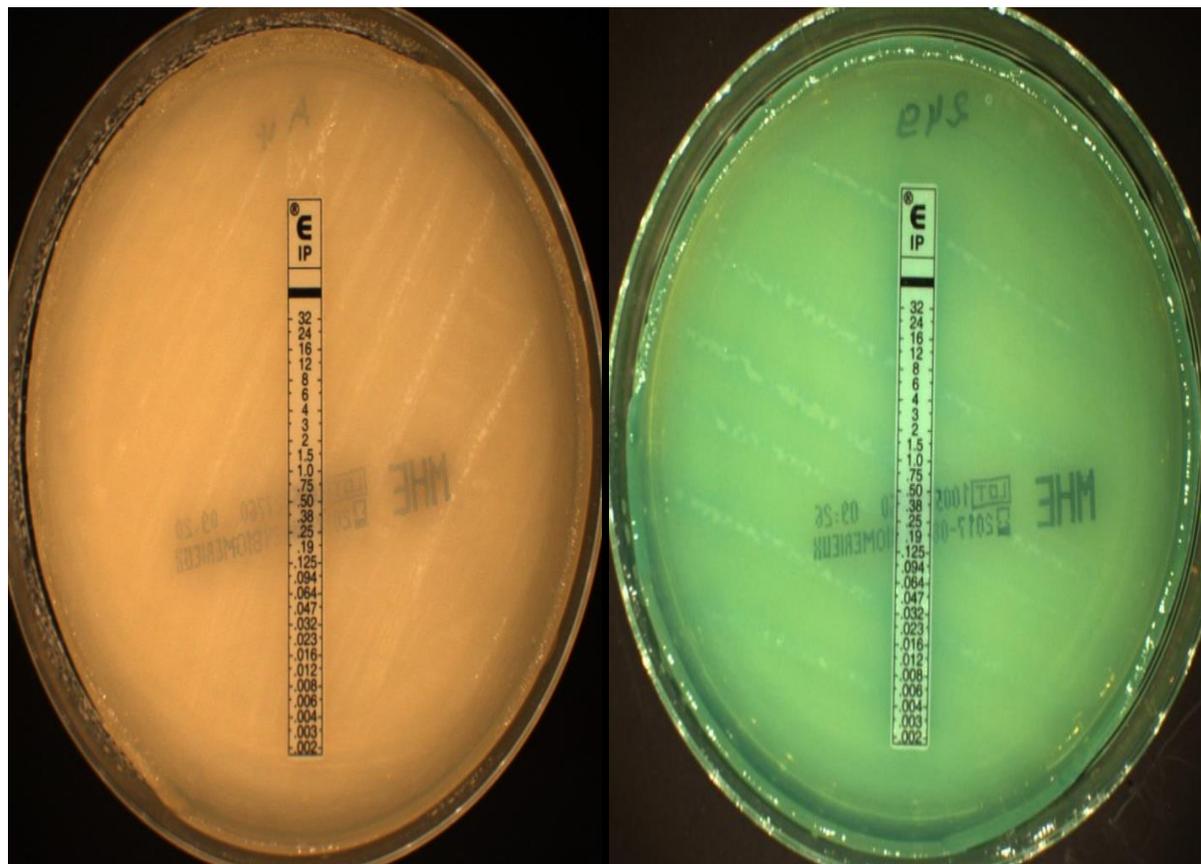


Figure 41: Exemples d'E-test imipénème d'une souche d'*A. baumannii* (A17) et *P. aeruginosa*(03) résistante

Les valeurs des CMI de l'imipénème des 21 souches d'*A. baumannii* et des 10 *P. aeruginosa* résistantes à cet antibiotique est à plus de 32 mg/l (résistant).(Figure 41)

6.4 Caractérisation génétique de la résistance des *A. baumannii* et *P. aeruginosa*

6.4.1 PCR en temps réel

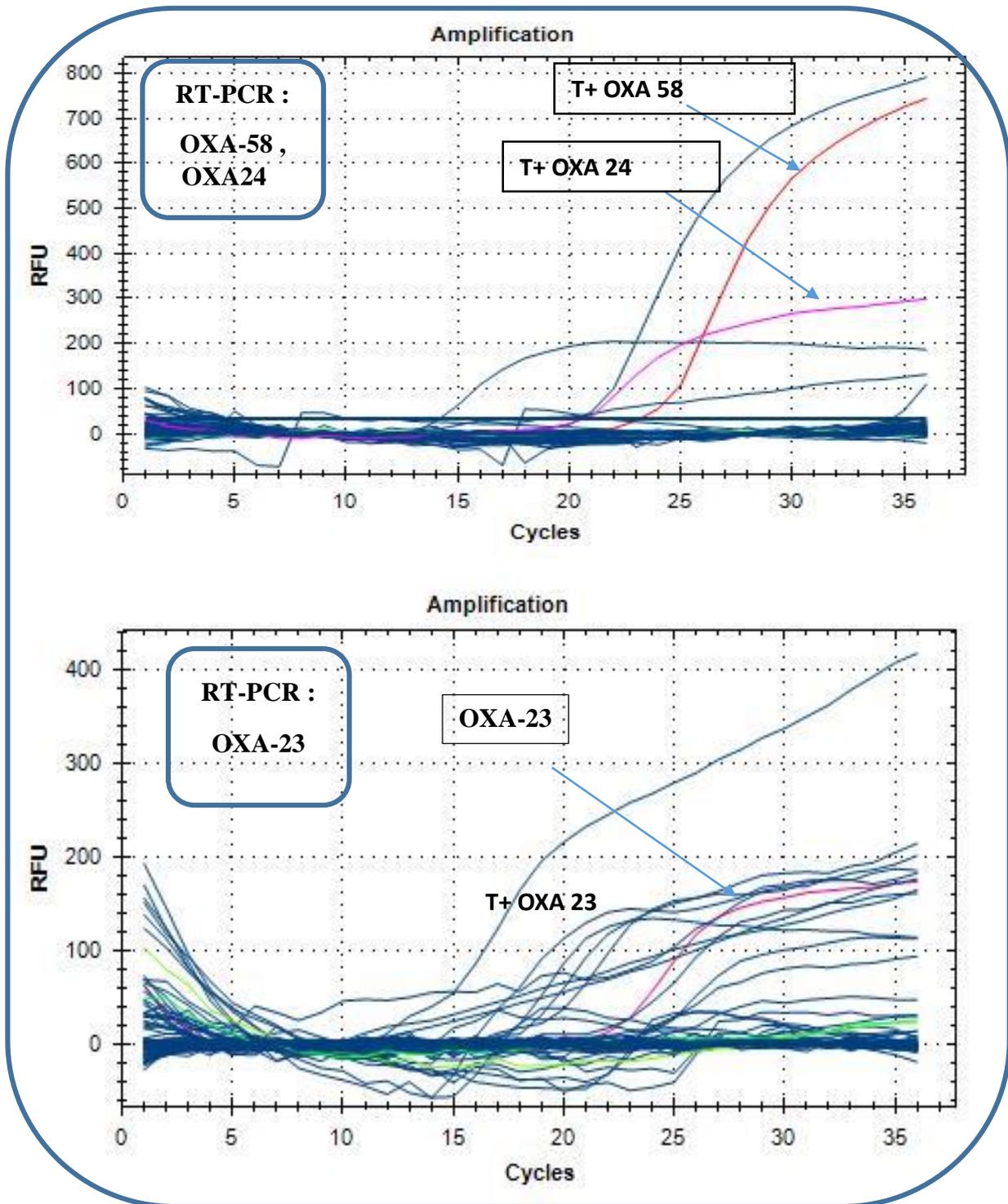


Figure 42: Amplification par RT-PCR du gène *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-23}*

La PCR en temps réel est une technique rapide et efficace qui permet le dépistage des gènes codant pour les carbapénèmases. Le résultat des produits de la PCR a révélé que sur les 21 souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipénème, une souche héberge le gène *bla_{OXA-24}* et une contient *bla_{OXA-58}* alors que dix souches possèdent le gène *bla_{OXA-23}*. (Figure 42). Aucune souche ne possède le gène *bla_{NDM-1}*. Pour les 10 souches de *P. aeruginosa* sont négatifs pour les gènes *bla_{VIM}* et *bla_{NDM-1}*.

6.4.2 Biotypage par MALDI- TOF MS

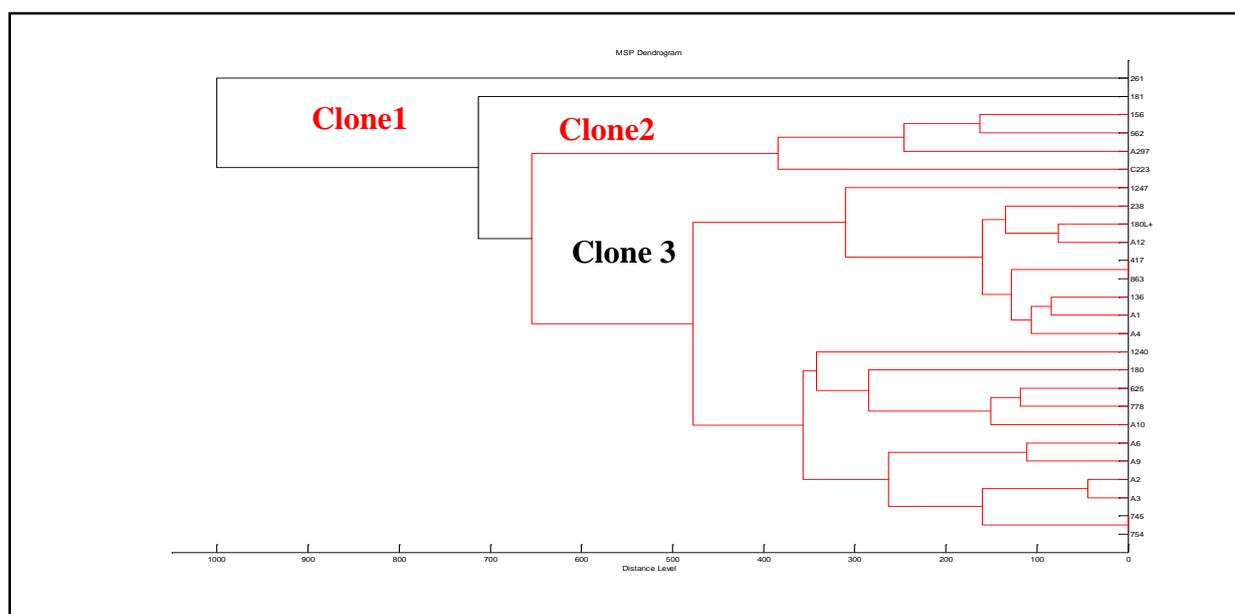


Figure 43: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des *A. baumannii*

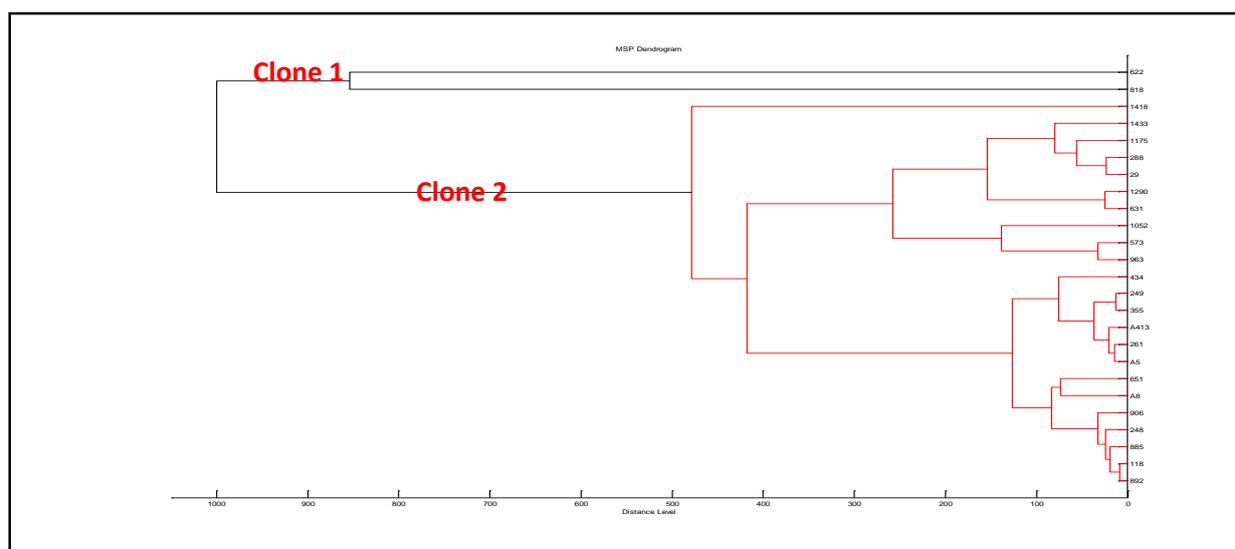


Figure 44: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des *P. aeruginosa*

A partir des spectres obtenus lors de l'identification des souches par MALDI TOF-MS, des dendrogrammes ont été réalisés pour les BGN-NF. Le dendrogramme de *P. aeruginosa* (Figure 44) a révélé la présence de 2 clones, la plupart des souches de *P. aeruginosa* sont regroupées dans le clone 2 ; Pour *Acinetobacter baumannii* on remarque la majorité des souches d'*A. baumannii* dans le clone 3 (Figure 43) , ce qui suggère la présence d'une épidémie dans le service d'urologie durant la période d'étude.

7. Les entérobactéries

La deuxième partie de notre étude a porté sur 83 bacilles à Gram négatif fermentaires (Entrobacteries), dont 45 *Klebsiella pneumoniae*, 14 *Escherichia coli*, 12 *Morganella morganii*, 12 *Enterobacter cloacae* collectés durant l'année 2015-2017 dans le laboratoire de microbiologie de CHU Ibn Rochd d'Annaba, et ce à partir de différents prélèvements cliniques provenant des patients hospitalisés dans le service d'urologie du CHU d'Annaba.

7.1 Origine et identification des souches isolées

D9	(+++)(A)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.57	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.50
E1	(+++)(A)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.37
E2	(+++)(A)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.38
E3	(+++)(A)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.39
E4	(+++)(A)	<i>Escherichia coli</i>	2.51	<i>Escherichia coli</i>	2.51
E5	(+++)(A)	<i>Escherichia coli</i>	2.35	Escherichia coli	2.37
E6	(+++)(A)	<i>Escherichia coli</i>	2.37	Escherichia coli	2.37
E7	(+++)(A)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.46
E8	(+++)(B)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.57
E9	(+++)(A)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.38
F1	(+++)(B)	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.38	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.33
F2	(+++)(A)	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.37	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.33
F3	(+++)(B)	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.32	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.38
F4	(+++)(C)	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.38	<i>Enterococcus cloacae</i>	2.39

Figure 45: Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF

L'identification des 83 entérobactéries par système API 20E (Biomérieux, Meylan, France) a été confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF avec de très bons scores allant de 1.90 à 2.35. (Figure 45) (Tableaux 26,27,28,29)

Tableau 26: Caractérisation des *K. pneumoniae* isolées en fonction de leur score MALDI-TOF

N° Souche	Date de prélevement	Type de prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI-TOF
K01	13/01/2015	Urine	M	67	[2.05-2.2]
K02	27/01/2015	Pus	M	58	[2.1-2.3]
K03	05/03/2015	Pus	F	31	[2.02-2.26]
K04	19/3//2015	Urine	F	52	[2.05-2.23]
K05	07/06/2015	Urine	M	25	[2.07-2.29]
K06	19/06/2015	Urine	M	73	[2.1-2.29]
K07	19/06/2015	Urine	M	53	[2.07-2.23]
K08	28/06/2015	Drain nephrostomie	M	19	[2.1-2.22]
K09	01/08/2016	Urine	F	32	[2.09-2.3]
K10	12/01/2016	Urine	M	48	[2.03-2. 1]
K11	29/03/2016	Urine	F	76	[2.07-2.2]
K12	28/02/2016	Sonde JJ	F	36	[2.2-2.3]
K13	01/02/2016	Sonde JJ	M	40	[2.1-2.3]
K14	08/03/2016	Sonde JJ	F	58	[2.07-2.24]
K15	01/06/2016	Sonde JJ	F	36	[2.2-2.31]
K16	01/06/2016	Sonde JJ	F	53	[2-2.12]
K17	09/06/2016	Sonde JJ	M	68	[2.05-2.17]
K18	16/06/2016	Sonde JJ	M	51	[1.99-2.23]
K19	03/07/2016	Pus	M	67	[2-2.26]
K20	04/07/2016	Pus	M	67	[2.01-2.29]
K21	09/08/2016	Sonde JJ	F	24	[2.02-2.31]
K22	03/02/2017	Pus	F	69	[2.05-2.29]
K23	02/08/2017	Pus	F	51	[1.98-2.21]
K24	14/09/2017	Urine	F	47	[2.01-2.28]
K25	03/02/2017	Pus	F	56	[2.02-2.22]
K26	19/03/2017	Pus	M	42	[2.05-2.19]
K27	10/05/2017	Pus	M	57	[2.02-2.31]
K28	04/06/2017	Pus	M	32	[2.05-2.13]

K29	22/06/2017	Pus	M	23	[2.01-2.29]
K30	02/08/2017	Pus	F	38	[2.05-2.31]
K31	28/09/2017	Pus	M	56	[2.1-2.19]
K32	16/10/2017	Pus	M	53	[2.05-2.2]
K33	26/11/2017	Pus	F	41	[2.1-2.3]
K34	28/12/2017	Pus	M	63	[2.02-2.26]
K35	01/02/2017	Sonde JJ	M	46	[2.02-2.31]
K36	05/02/2017	Sonde JJ	F	50	[2.05-2.13]
k37	26/02/2017	Sonde JJ	F	43	[2.01-2.29]
k38	30/04/2017	Sonde JJ	F	69	[2.02-2.31]
k39	08/06/2017	Sonde JJ	M	35	[2.05-2.29]
k40	17/07/2017	Sonde JJ	F	58	[1.98-2.21]
k41	14/09/2017	Sonde JJ	M	64	[2.01-2.28]
k42	14/09/2017	Sonde JJ	F	60	[2.02-2.22]
k43	03/04/2016	Sonde JJ	F	53	[2.05-2.19]
k44	18/04/2016	Sonde JJ	M	65	[2.1-2.3]
k45	08/05/2016	Sonde JJ	M	43	[2.02-2.26]

Tableau 27: Caractérisation des *E.coli* isolées en fonction de leur score MALDI-TOF

N° souche	Date de prélèvement	Nature de prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI-TOF
E01	21/09/2015	Sonde JJ	M	48	[2.02-2.32]
E02	15/02/2016	Sonde JJ	F	63	[2.19-2.30]
E03	03/03/2016	Pus	F	35	[1.92-2.30]
E04	29/03/2016	Sonde JJ	F	54	[2.04-2.31]
E05	05/06/2016	Pus	M	61	[1.98-2.12]
E06	04/07/2016	Pus	M	67	[2.25-2.35]
E07	24/07/2016	Sonde JJ	M	31	[1.99-2.31]
E08	03/08/2016	Sonde JJ	F	22	[1.91-2.32]
E09	30/01/2017	Pus	M	58	[2.29-2.36]
E10	14/04/2017	Sonde JJ	F	42	[1.95-2.34]
E11	23/04/2017	Sonde JJ	F	39	[2.05-2.31]
E12	20/06/2017	Sonde JJ	M	66	[2.22-2.30]
E13	27/09/2017	Sonde JJ	F	35	[2.27-2.35]
E14	02/10/2017	Sonde JJ	M	64	[1.90-2.30]

Tableau 28: Caractérisation des *M.morganii* isolées en fonction de leur score MALDI-TOF

N° souche	Date de prélèvement	Nature de prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI-TOF
M01	01/02/2015	Pus	F	38	[1.90-2.30]
M02	19/03/2015	SondeJJ	F	48	[2.19-2.30]
M03	25/03/2015	SondeJJ	F	57	[2.28-2.30]
M04	28/06/2015	Drain nephrostomie	M	32	[2.25-2.30]
M05	28/06/2015	Pus	M	32	[1.90-2.30]
M06	03/11/2015	Pus	M	71	[2.24-2.30]
M07	15/02/2016	Drain kystique	F	63	[2.23-2.35]
M08	22/03/2016	Pus	M	52	[1.90-2.30]

M09	20/04/2016	SondeJJ	F	42	[2.12-2.34]
M10	18/05/2016	Pus	M	47	[2.28-2.35]
M11	24/07/2016	SondeJJ	M	59	[1.9-2.30]
M12	19/10/2016	Pus	M	73	[2-2.3]

Tableau 29: Caractérisation des *Enterobacter cloacae* isolées en fonction de leur score MALDI-TOF

N° souche	Date de prélevement	Nature de prélevement	Sexe	Age	Score MALDI-TOF
E01	10/02/2016	Pus	M	52	[1.99-2.23]
E02	03/03/2016	Urine	M	47	[2-2.26]
E03	09/03/2016	Urine	M	42	[2.01-2.29]
E04	14/03/2016	Sonde JJ	M	51	[2.02-2.31]
E05	16/07/2016	Urine	M	65	[2.05-2.29]
E06	19/11/2016	Sonde JJ	M	35	[1.98-2.21]
E07	30/11/2016	Pus	F	53	[2.01-2.28]
E08	30/11/2016	Pus	F	45	[2.02-2.22]
E09	02/01/2017	Pus	M	60	[2.05-2.19]
E10	02/02/2017	Urine	F	30	[2.02-2.31]
E11	24/08/2017	Urine	M	80	[2.05-2.13]
E12	29/10/2017	Drain de nephrostomie	M	41	[2.01-2.29]

7.2 Répartition des souches bactériennes

Tableau 30: Répartition des entérobactéries selon les espèces

Souches bactériennes	Nombre	Pourcentage %
<i>K.pneumoniae</i>	45	54
<i>E.coli</i>	14	17
<i>E.cloacae</i>	12	14
<i>M.morganii</i>	12	15

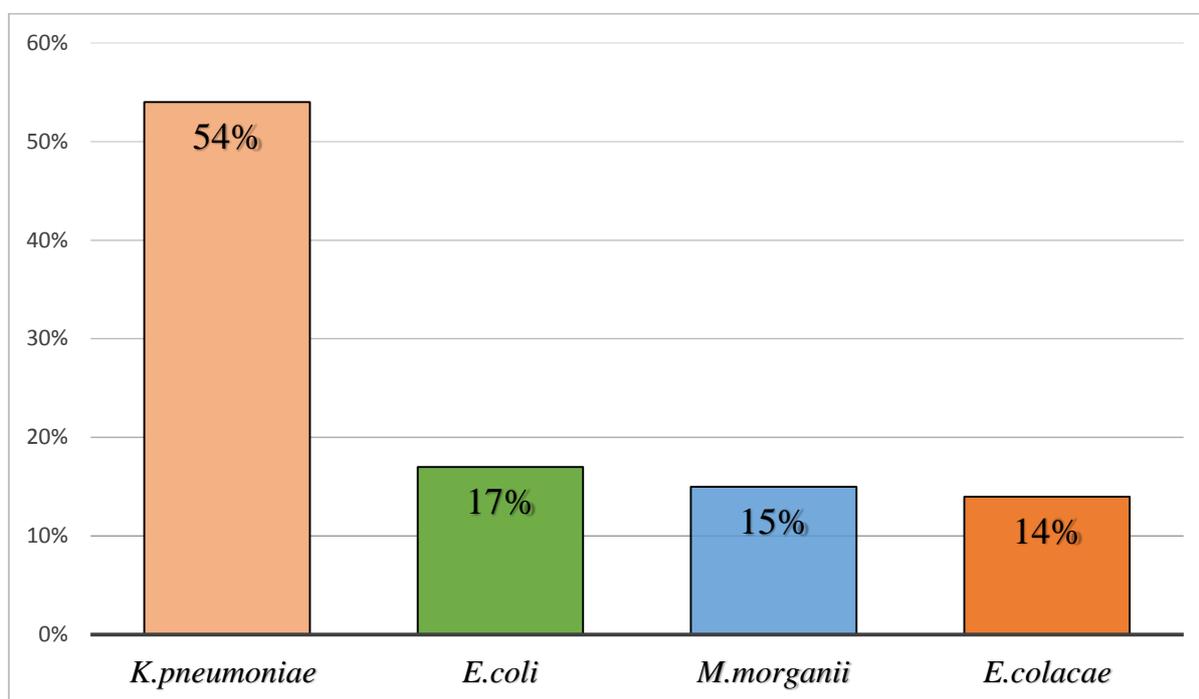


Figure 46: Répartition des entérobactéries selon les espèces

Parmi les 83 souches d'entérobactéries, la dominance a été attribuée à *K.pneumoniae* (54%) (Figure 46).

Tableau 31: Répartition des patients infectés selon le sexe

Souches bactériennes	Masculin	%	Feminin	%	total	%
<i>K.pneumoniae</i>	24	53	21	47	45	100
<i>E.cloacae</i>	09	75	03	25	12	100
<i>E.coli</i>	07	50	07	50	14	100
<i>M.morganii</i>	05	42	07	58	12	100

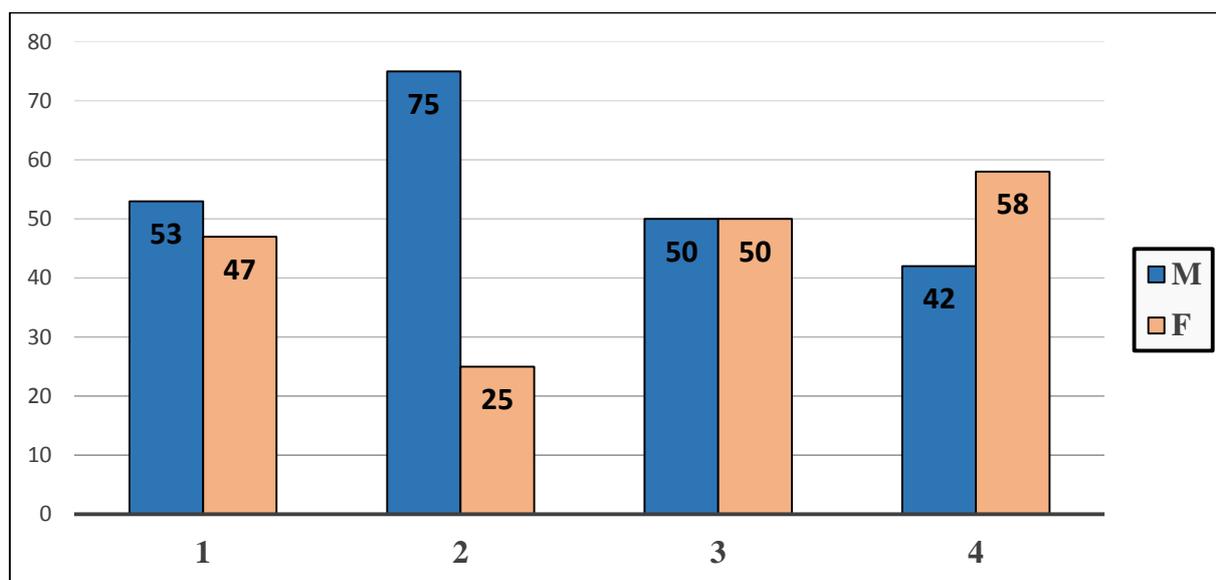


Figure 47: Répartition des patients infectés selon le sexe par : (01) *K.pneumoniae*, (02,) *E.cloacae* (03) *E.coli* (04) *M.morganii*

M : masculin, F : féminin

Pour les 45 souches de *K.pneumoniae*, 24 (53%) ont été isolées chez les hommes et 21(47%) chez les femmes.

Concernant les 14 *E.coli* on a noté 07 (50%) chez les hommes et 07 (50%) chez les femmes, quant aux 12 souches de *M.morganii* on a observé 5(42%) chez les hommes et 7(58%) chez les femmes. A propos des 12 souches d'*E.cloacae*, 09 (75%) souches ont été remarquées chez les hommes et 03(25%) chez les femmes. (Figure47)

Tableau 32: Répartition des patients infectés selon l'âge

Souches	19-40 ans	%	40-60 ans	%	>60 ans	%
<i>K.pneumoniae</i>	12	27	21	46	12	27
<i>M.morganii</i>	03	25	06	50	03	25
<i>E.colacae</i>	02	16	08	67	02	17
<i>E.coli</i>	05	36	04	28	05	36

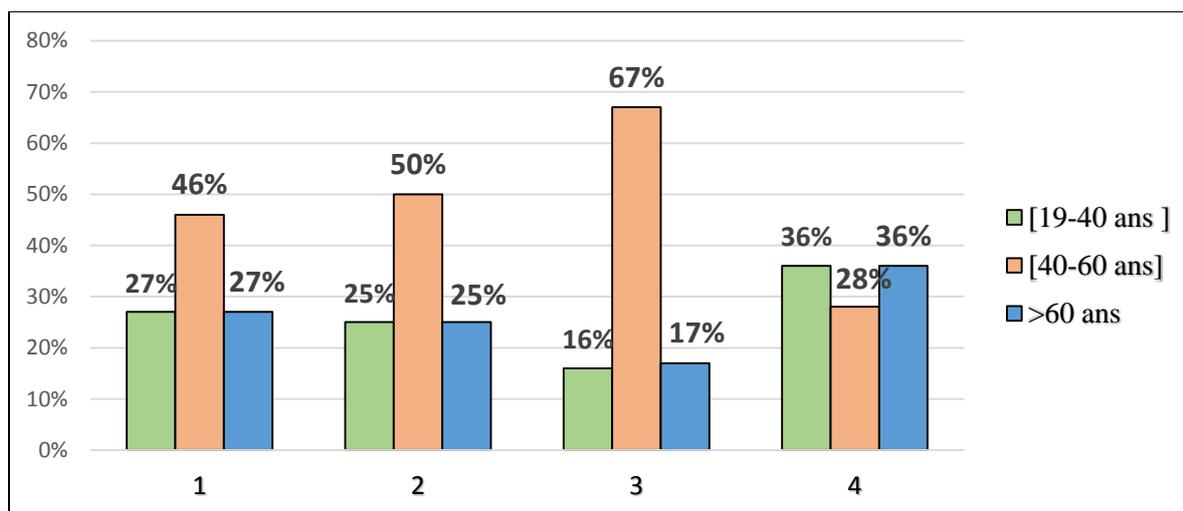


Figure 48: Répartition des patients infectés par : (01) *K.pneumoniae*, (02) *M.morganii*, (03) *E.colacae* (04) *E.coli* selon l'âge

En ce qui concerne l'âge, toutes les tranches d'âge sont susceptibles aux infections nosocomiales. Dans notre étude, la catégorie la plus touchée est celle de 40 à 60 ans, avec un taux de 46% pour les *K.pneumoniae*, 50% pour les souches de *M.morganii*, 67 % de souches d'*E.colacae* tandis que cette tranche d'âge est moins touchée chez les souches d'*E.coli*. (Figure 48)

Tableau 33: Répartition des patients infectés selon la période d'étude

	2015	%	2016	%	2017	%
<i>K.pneumoniae</i>	08	18	16	35	21	47
<i>E.coli</i>	01	07	07	50	06	43
<i>M.morganii</i>	06	50	06	50	00	00
<i>E.colacae</i>	00	00	08	67	04	33

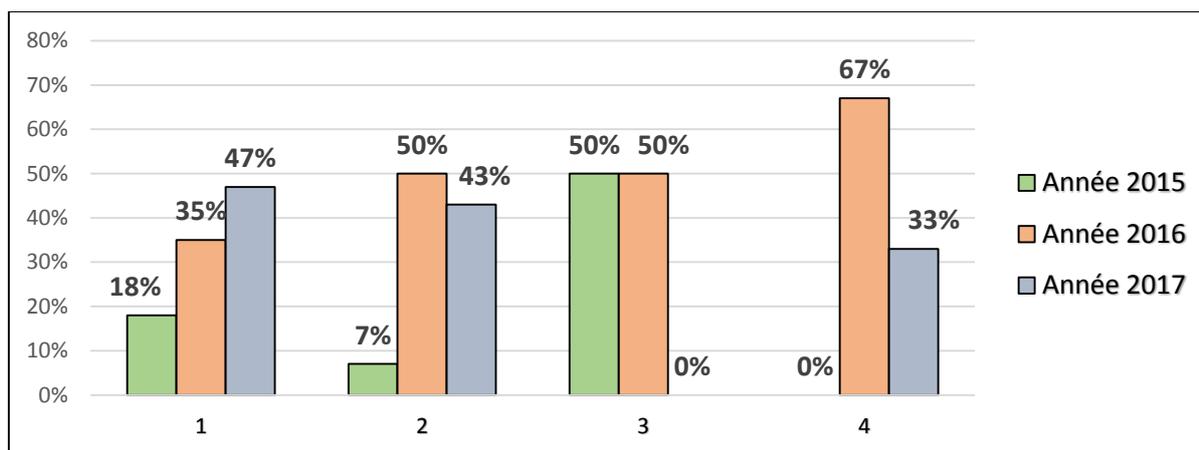


Figure 49: Répartition des patients infectés par : (01) *K.pneumoniae*, (02) *E.coli*, (03) *M.morganii*, (04) *E.clocae* selon la période d'étude

Les souches d'entérobactéries ont été isolées de patients hospitalisés pendant une période de 3 ans : En 2015, 18% (08) *K.pneumoniae*, 7%(01) *E.coli*, 50% (06) *M.morganii* ont été isolées et aucune souche n'a été isolée pour les *E.clocae*.

En 2016, 35% (16) *K.pneumoniae*, 50% (07) *E.coli*, 50%(06) *M.morganii* et 67% (08) *E.clocae*.

En 2017, 47% (21) *K.pneumoniae*, 43% (07) *E.coli*, 33% (04) *E.clocae* et aucune souche n'a été isolée pour les *M.morganii*. (Figure49).

Tableau 34: Répartition des patients infectés par les souches d'entérobactéries selon la nature de prélèvement

	Nombre	Pourcentage %
Pus	30	36%
Sonde JJ	35	42%
Urine	14	17%
Drain nephrostomie	3	4%
drain kystique	1	1%

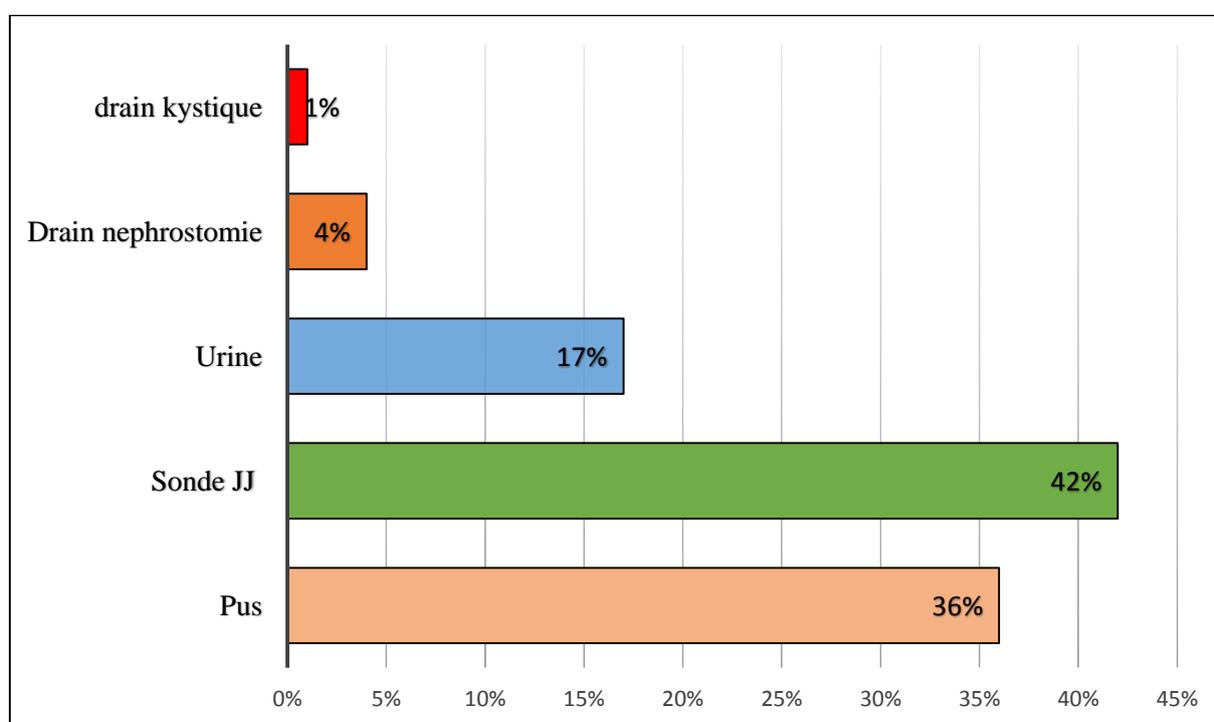


Figure 50: Répartition des patients infectés par les souches d'entérobactéries selon la nature de prélèvement

Ces 83 souches d'entérobactéries ont été isolées à partir de divers prélèvements, 42%(35) ont été isolées des urines du patient sondé, 36%(30) de pus, 17%(14) des urines, 4%(3) des drains de néphrotomie et 1% de drains kystique. (Figure 50)

7.3 L'étude de la sensibilité aux antibiotiques

7.3.1 Antibiogramme par diffusion de disques sur un milieu gélosé

Les souches isolées dans notre étude, sont des BMR, avec des taux de résistance aux antibiotiques très élevés.

L'antibiogramme des entérobactéries a révélé une résistance très élevée aux β - lactamines particulièrement aux céphalosporines ainsi que pour les aminosides, particulièrement pour la Gentamicine. En revanche, aucune résistance à la colistine n'a été notée.

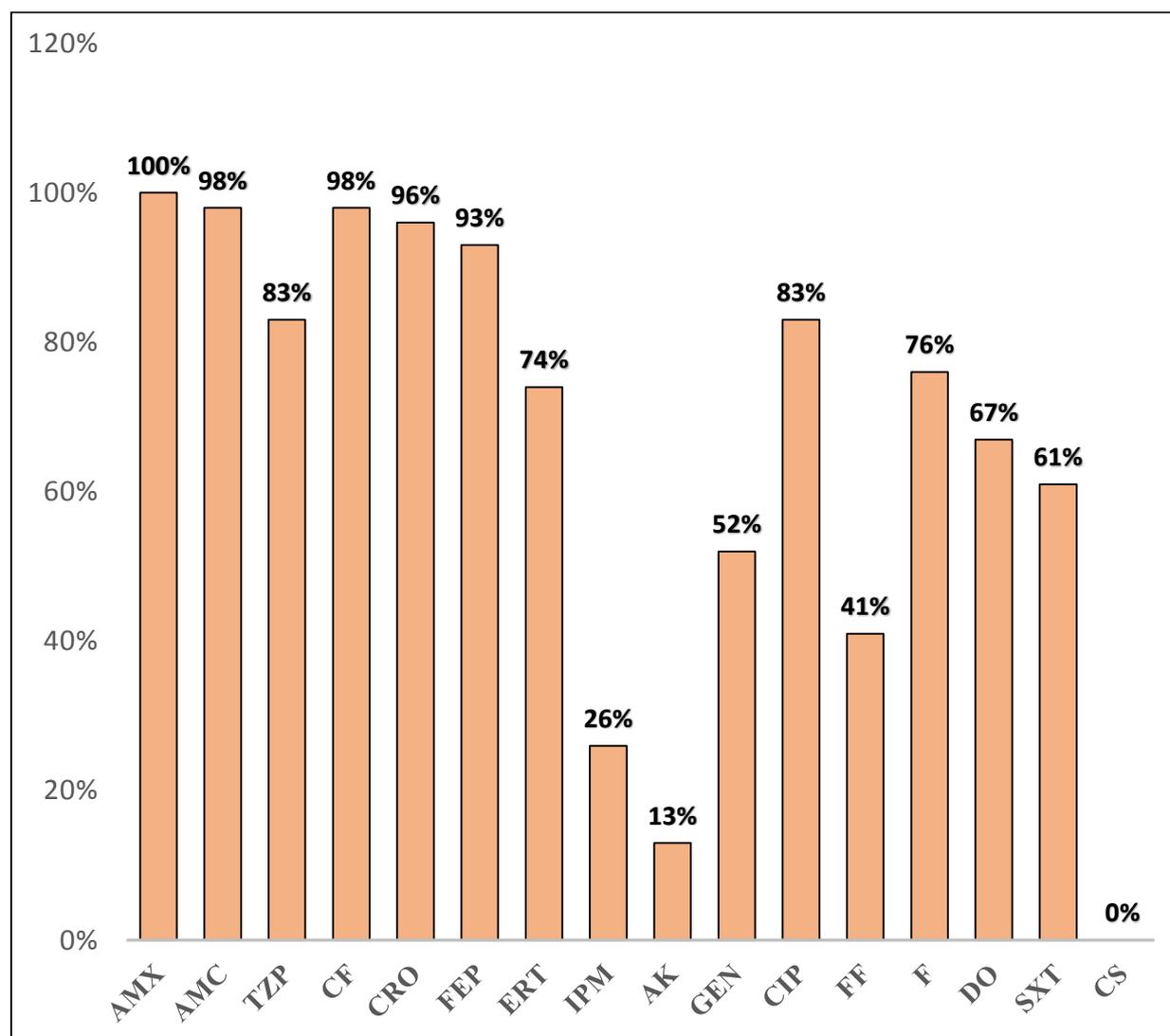


Figure 51: Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae*

AMX : Amoxicilline ; **AMC** : Amoxicilline + acide clavulanique ; **TZP** : Pipéracilline-tazobactam ; **CF** : Céfalo-tine ; **CRO** : Ceftriaxone, **FEP** : Céfépime ; **ERT** : Ertapénème ; **IMP** : Imipénème ; **AK** : Amikacine ; **GEN** : Gentamicine ; **CIP** : Ciprofloxacine ; **FF** : Fosfomicine ; **F** : Nitrofurantoïne ; **DO** : Doxycycline ; **SXT** : triméthoprime/sulfaméthoxazole ; **CS** : colistine.

Chez *K. pneumoniae*, on a noté une résistance de haut niveau vis-à-vis des β -lactamines et une résistance vis-à-vis des carbapénèmes (ertapénème et imipénème) a été remarquée avec un taux 74% et 26% respectivement. Pour les autres antibiotiques, plus de 50% ont présenté une résistance à la triméthoprine/sulfaméthoxazole, la gentamicine et la ciprofloxacine. (Figure 51).

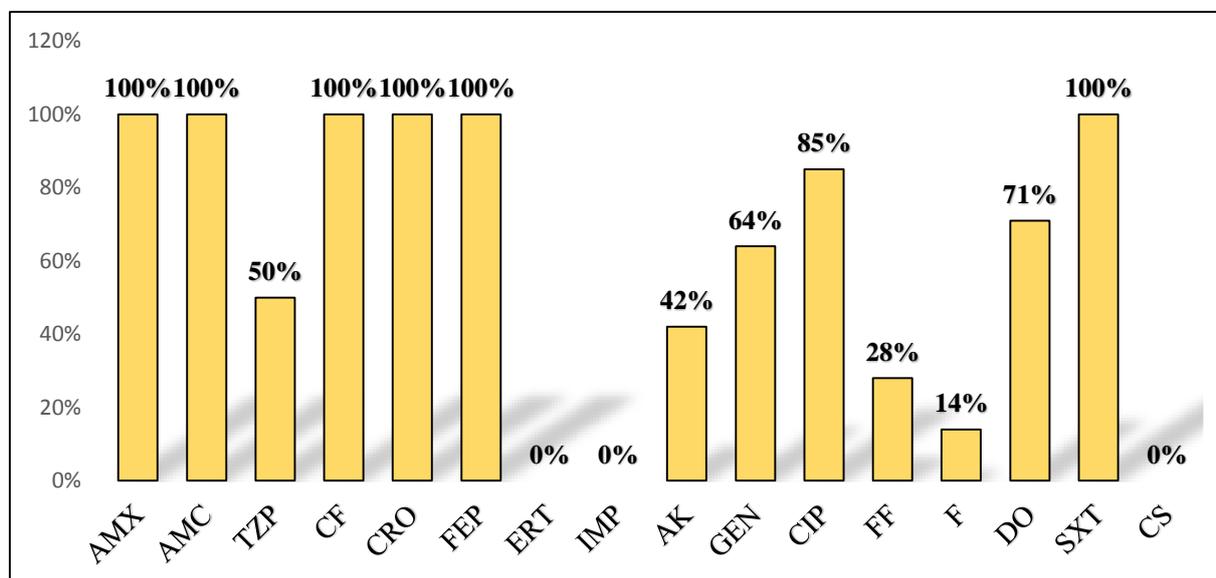


Figure 52: Profil de résistance aux antibiotiques des souches d'*E.coli*

Pratiquement 100%, a été le taux de résistance des *E. coli* vis-à-vis des β -lactamines, aucune résistance pour les carbapénèmes et 50% pour TZP. Également, des taux de résistance remarquables, entre 64% et 100%, ont été notés vis-à-vis de la triméthoprine/sulfaméthoxazole, la gentamicine, la ciprofloxacine. Aucune résistance n'a été observée vis-à-vis de la Colistine. (Figure 52)

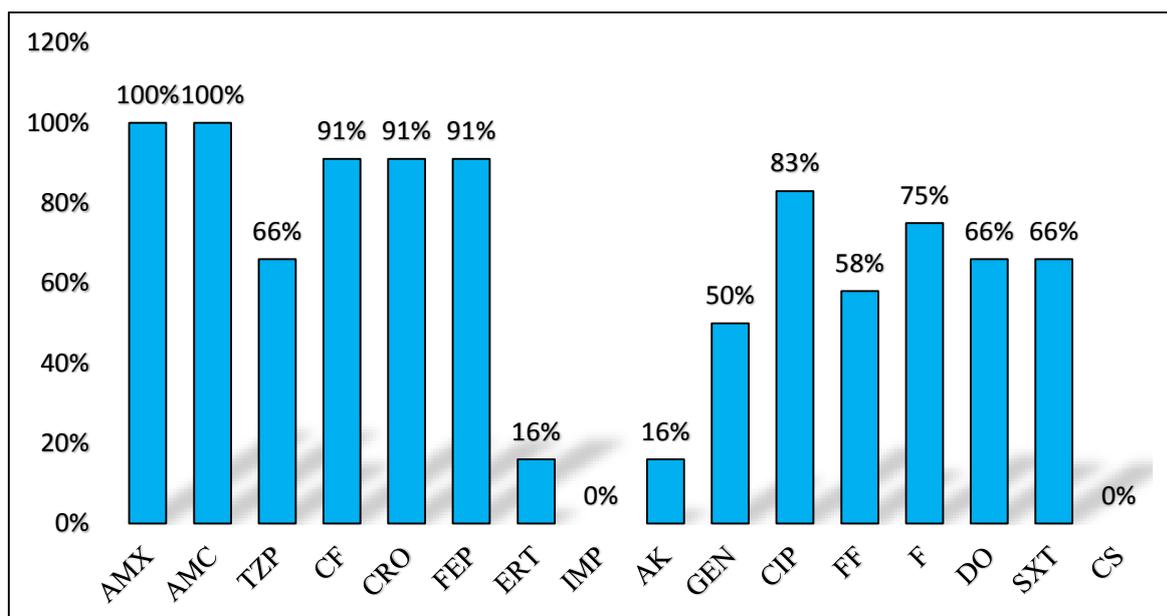


Figure 53: Profil de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. cloacae*

E. cloacae a présenté un haut niveau de résistance aux β -lactamines même vis-à-vis des carbapénèmes (ertapénème 16%), et aucune résistance pour imipénème. Des taux de résistance remarquables vis-à-vis de la ciprofloxacine et la gentamicine. (Figure 53)

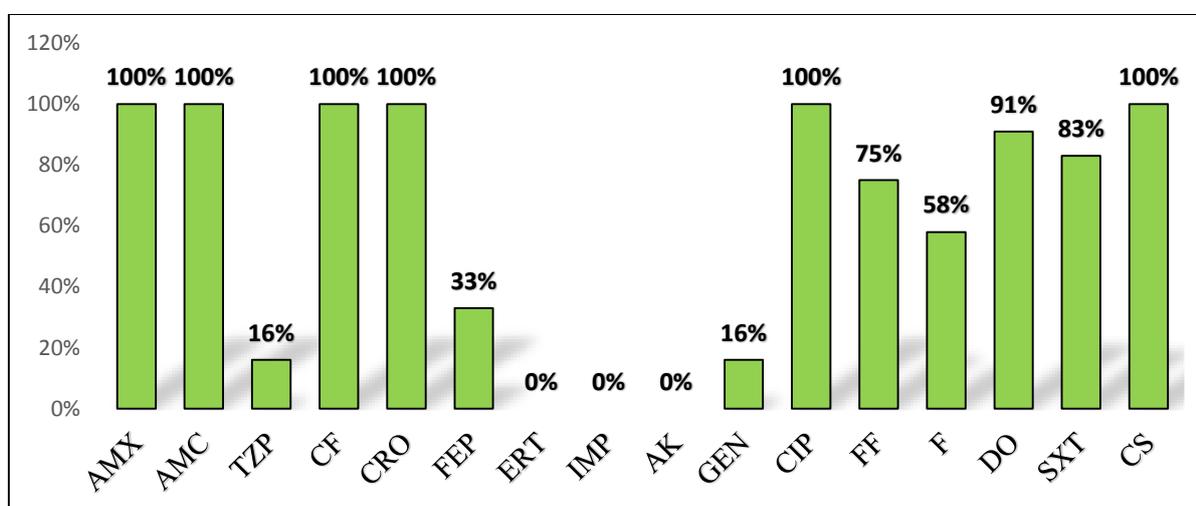


Figure 54: Profil de résistance aux antibiotiques des souches *M. morgani*

M. morgani a présenté des taux de 100% de résistance aux β -lactamines à l'exception des carbapénèmes, dont aucune résistance n'a été détectée. Pour les aminosides, une faible résistance a été remarquée, 16% vis-à-vis de la Gentamicine et aucune résistance vis-à-vis de l'amikacine et un taux de 100% pour la ciprofloxacine. (Figure 54)

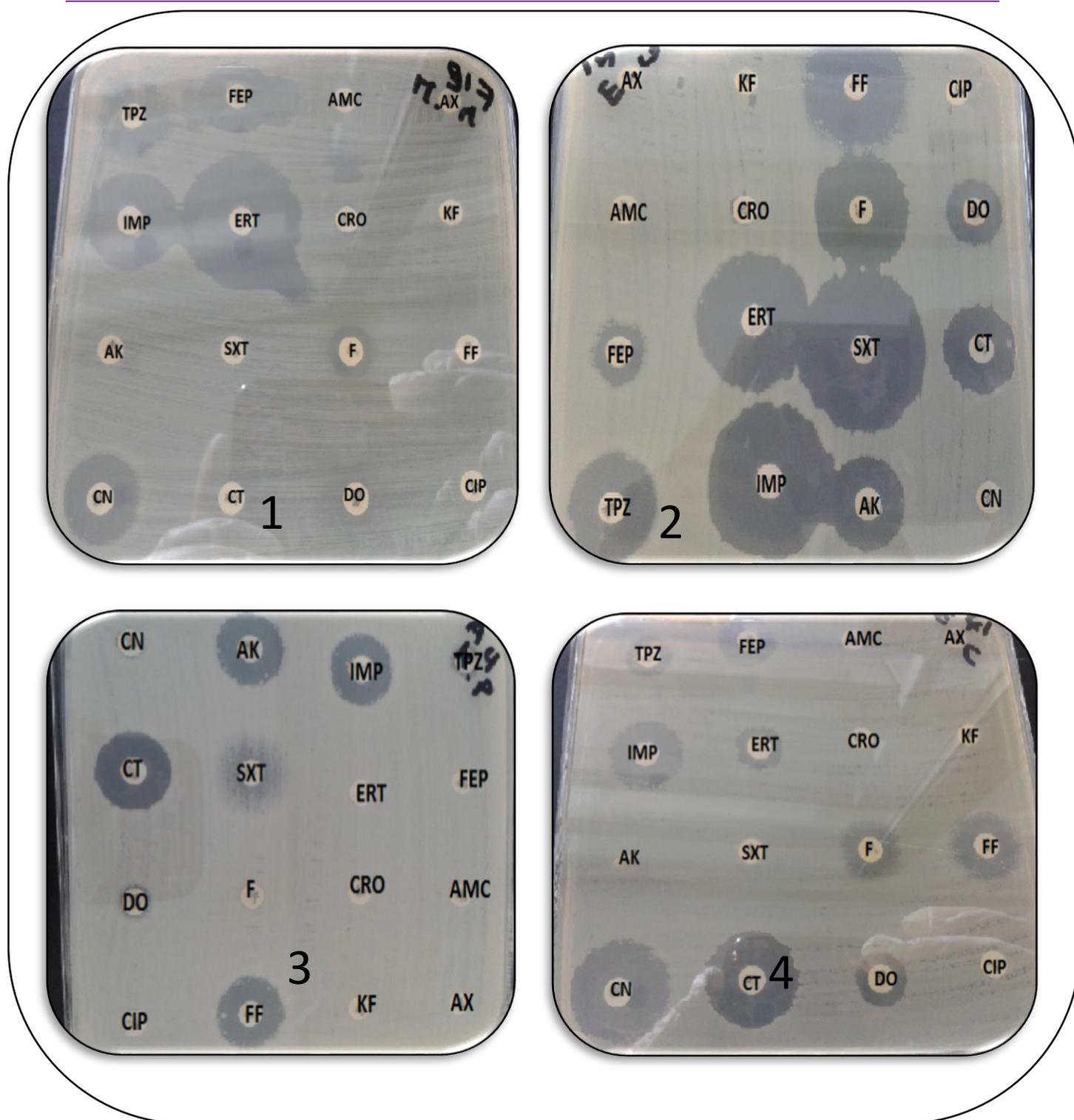


Figure 55: Exemples des antibiogrammes des entérobactéries multi-résistants

1- *M.morganii* 2- *E.coli* 3- *K. pneumoniae* 4- *E.cloacae*

7.3.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'imipénème par E-test

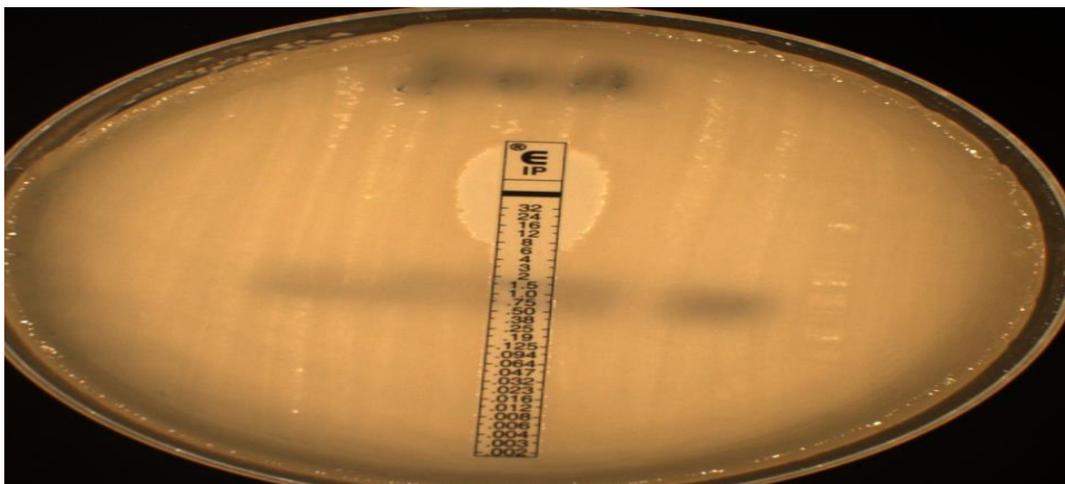


Figure 56: Exemples des CMI d'imipénème de souche de *K. pneumoniae* K42 résistantes à l'imipénème

Les bandelettes d'E-test IMP ont été utilisées pour 15 souches sur les 83 d'entérobactéries ayant présenté un diamètre réduit vis-à-vis des carbapénèmes (imipénème et/ou ertapénème). Dont 14 *K. pneumoniae* et 01 *E. cloacae*.

Les CMI d'imipénème vis-à-vis des entérobactéries résistantes à l'ertapénème ont été rangées de 3 µg/ mL à 32 µg/ mL. 8 souches sont avérées résistantes/ intermédiaires à l'imipénème de 1 µg/ mL à 8 µg/ mL.

7.3.3 Recherche phénotypique des β -lactamases

7.3.3.1 Recherche de BLSE

➤ Test de synergie

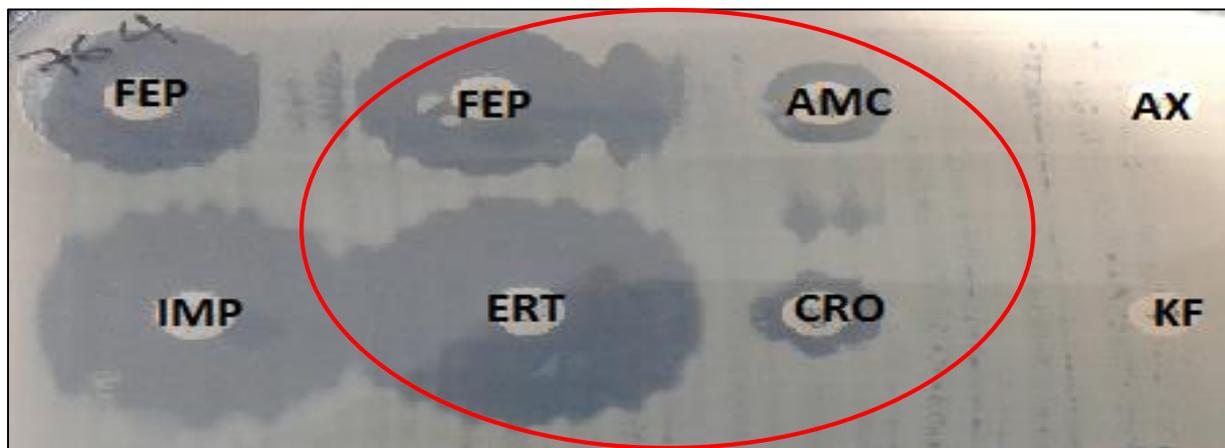


Figure 57 : Exemple de synergie entre les C3G et l'AMC chez une souche de *K. pneumoniae*

Pour détecter les β -lactamases à spectre étendu (BLSE), le test de synergie a été réalisé. La lecture des résultats a révélé la présence d'une zone d'élargissement autour des disques en «bouchon de champagne» ou en «entonnoir» entre les C3G et l'AMC chez 68 souches (31 *K. pneumoniae*, 14 *E.coli*, 12 *M.morganii*, 11 *E. cloacae*.) indiquant clairement la production de BLSE par ces souches. (Figure 57).

7.3.3.2 Recherche de carbapénèmases

➤ Test de Hodge

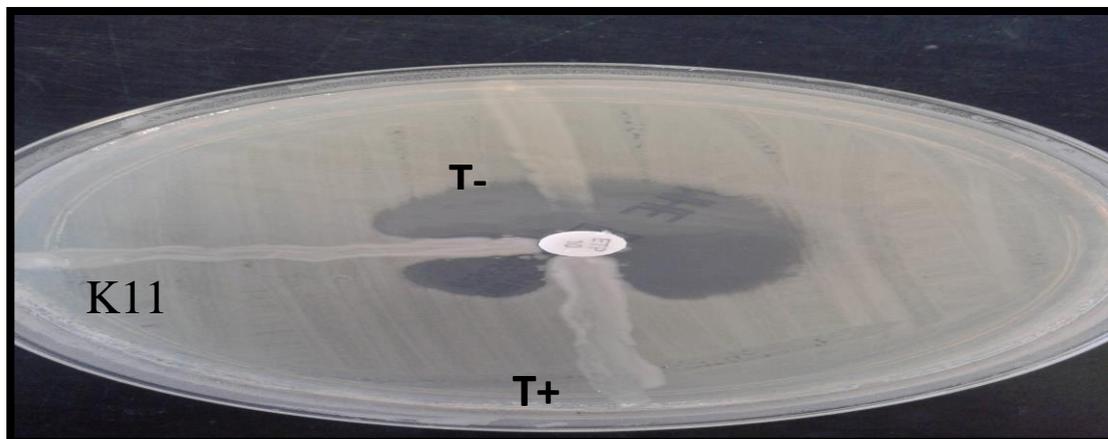


Figure 58: Résultat positif *K. pneumoniae* (K11) d'MHT

T-. Témoin négatif ; T+. Témoin positif

Les 14 souches de *K. pneumoniae* résistantes à l'imipénème et ertapénème sont toutes positives au test de Hodge ce qui suggère la production de carbapénèmases.

➤ Test EDTA

Le résultat du test de synergie EDTA-IMP des 14 souches de *K. pneumoniae* et 01 d'*E. cloacae* résistantes à l'imipénème et ertapénème est négatif. En effet, après une incubation de 24 heures à 37°C, le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA n'augmente pas par rapport à celui obtenu avec le disque d'imipénème seul ce qui confirme l'absence de la production de toute MBL.

➤ Carba NP test modifié

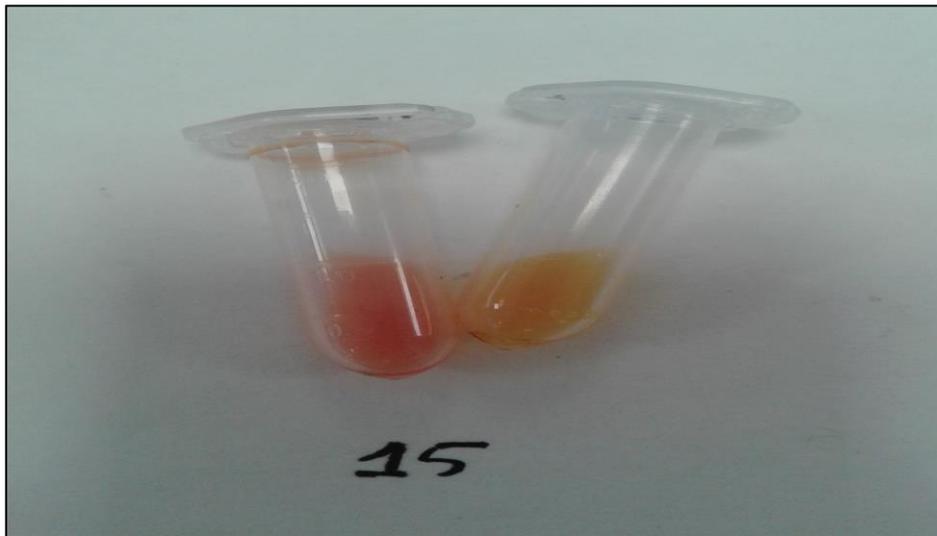


Figure 59: Résultat positif *K. pneumoniae* du test MCNP

Toutes les souches de *K. pneumoniae* et une souche d'*E. cloacae* résistantes à l'imipénème et ertapénème sont positives au Carba NP test modifié ce qui confirme la production de carbapénémases. En effet, l'indicateur du pH a changé de couleur du rouge vers l'orange suite à l'acidification du milieu traduisant l'hydrolyse de l'imipénème par les enzymes de type oxacillinases.

7.4 Caractérisation génétique de la résistance des BGN aux β -lactamines

7.4.1 PCR en temps réel

La PCR en temps réel a été effectuée pour la détection des BLSE (CTX-M, TEM, SHV) et les carbapénémases (KPC, OXA-48, NDM-1) chez les souches résistantes à l'ertapénème ou de l'imipénème.

15 souches entérobactéries (14 *K. pneumoniae* et 01 *E. cloacae.*), parmi les 83 souches, ont été testées.

Les 12 (14%) souches possèdent une carbapénémase du type OXA-48, dont 11 *K.pneumoniae* et 1 *E. cloacae.* (Figure 61)

3 (03%) souches de *K. pneumoniae* seulement possèdent une carbapénémase du type KPC. (Figure 60)

Les 14 souches de *K. pneumoniae* possèdent les gènes CTX-M, SHV, TEM. (Figure 60)

Aucune souche ne possède les gènes NDM-1.

7.4.2 PCR standard

L'amplification par PCR standard en utilisant les amorces spécifiques qui codent pour les BLSE et les carbapénémases détectés dans la RT-PCR (CTX-M, TEM, SHV, OXA-48 et KPC) et la révélation des gènes par l'électrophorèse en gel d'agarose ont montré les mêmes résultats obtenus par la RT-PCR. (Figures 62,63).

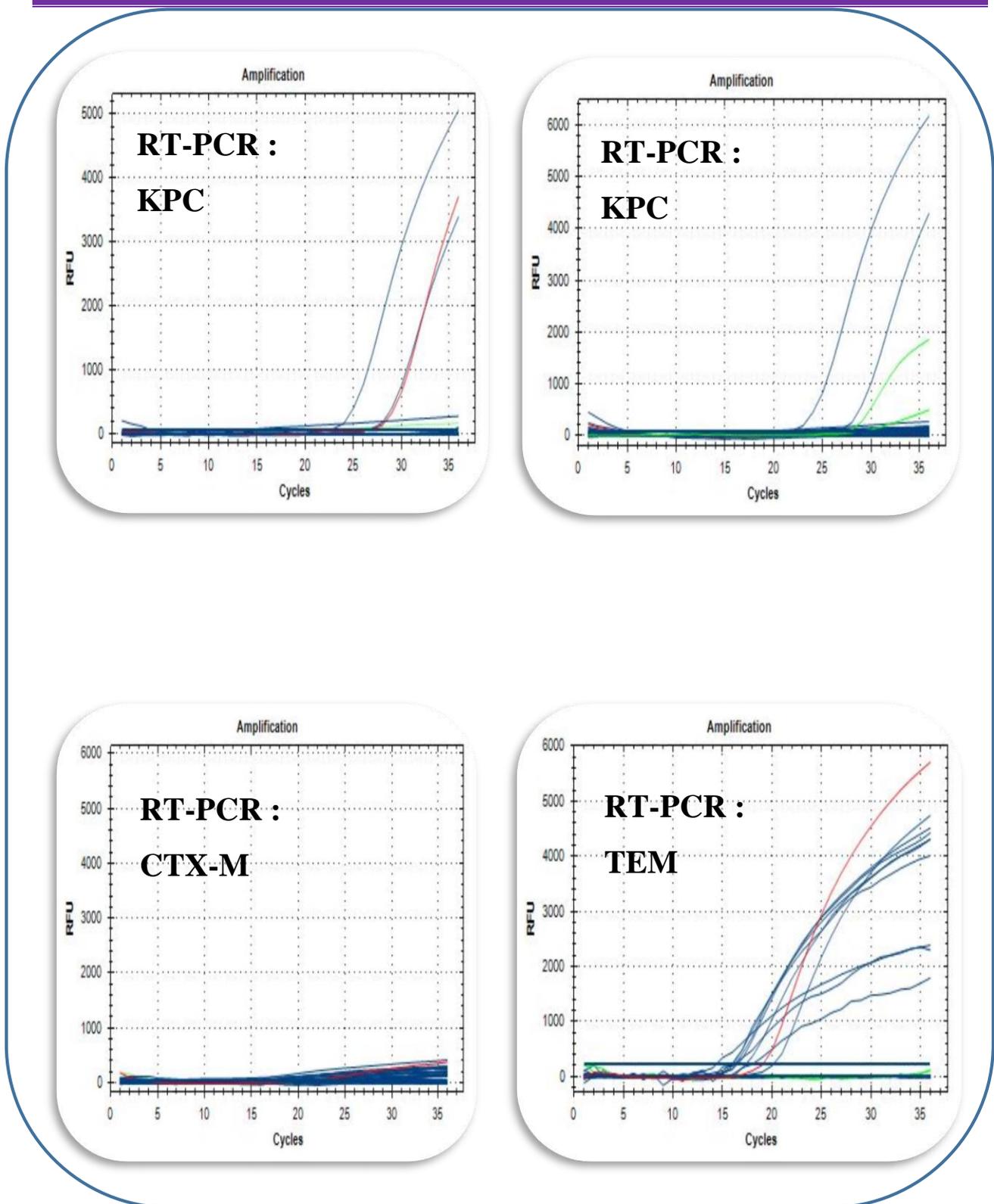


Figure 60: Amplification par RT-PCR du gène bla-KPC, bla-CTX-M, bla-TEM

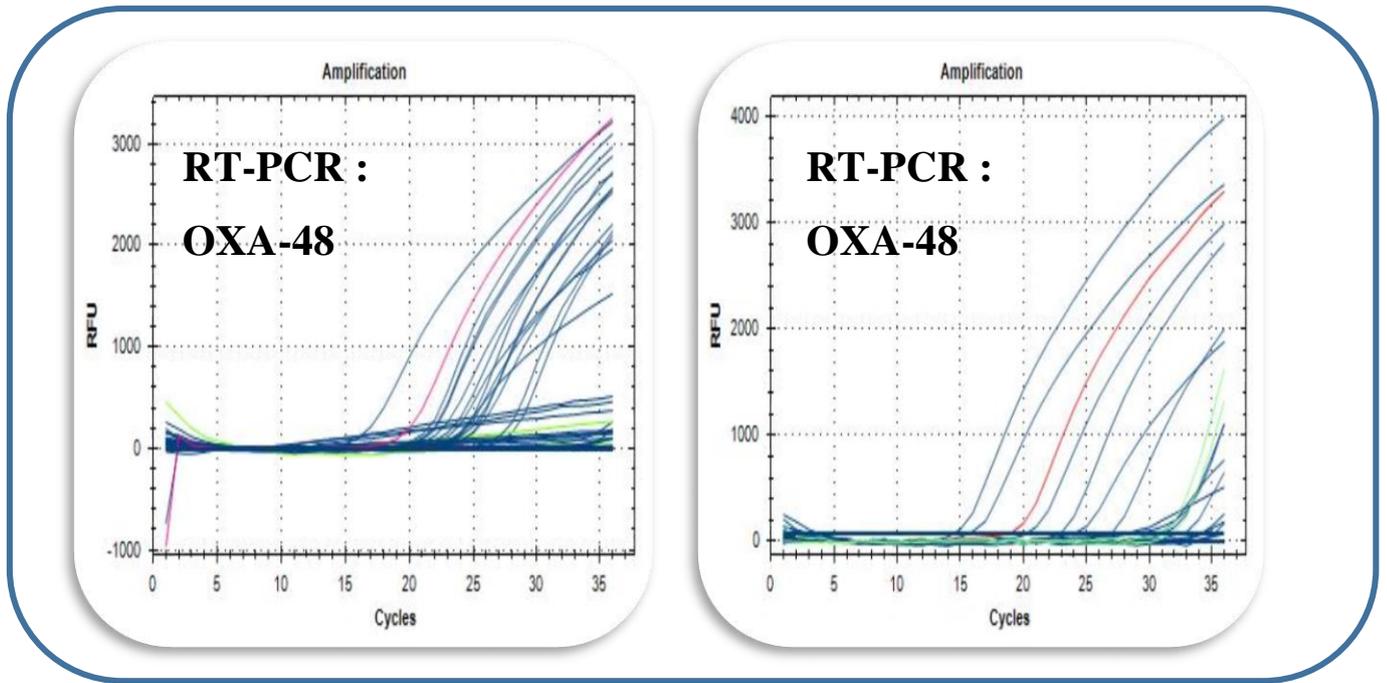


Figure 61: Amplification par RT-PCR du gène bla-OXA48

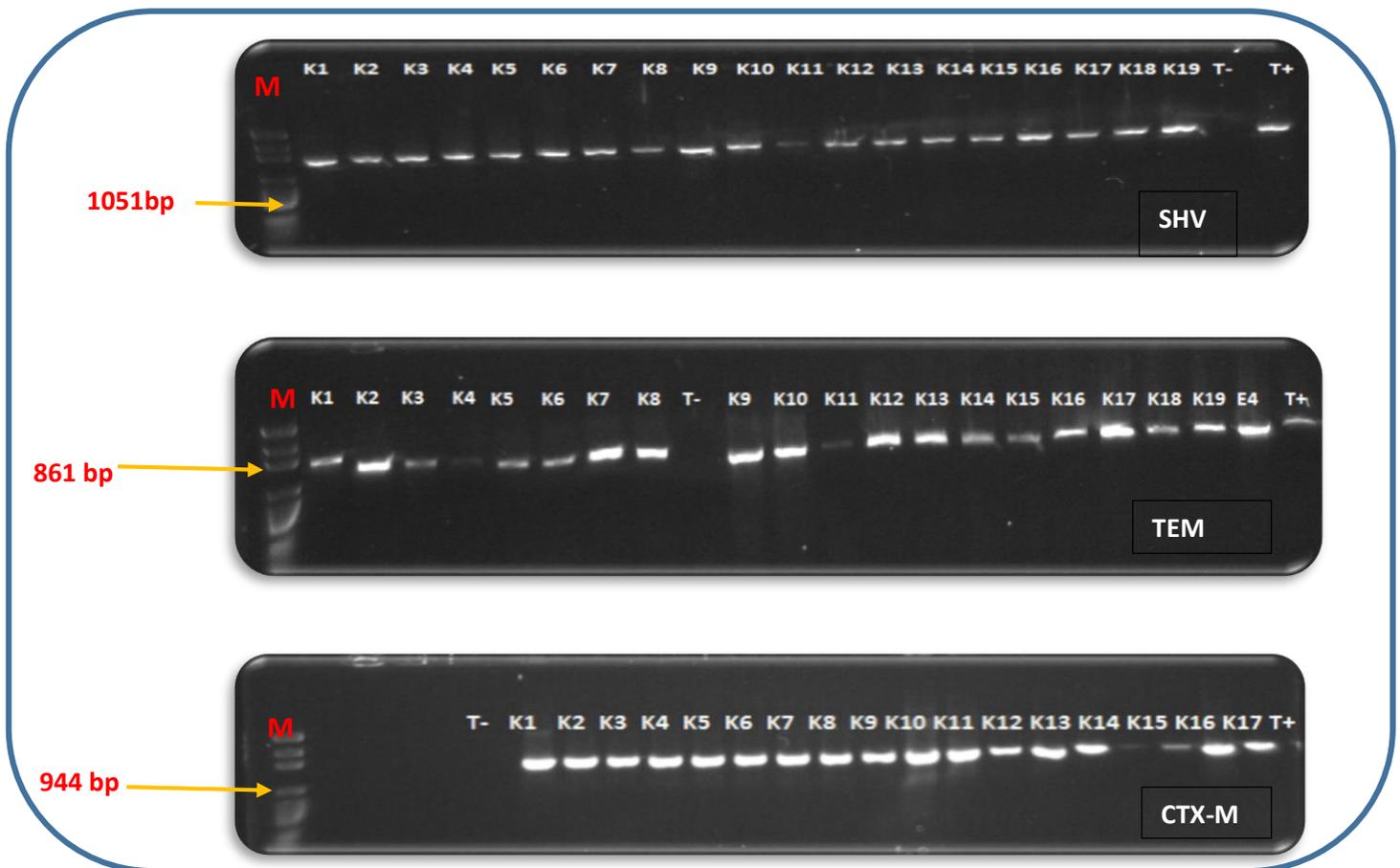


Figure 62: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes blaCTX-M, blaTEM, et blaSHV.



Figure 63: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR de gène blaKPC et bla OXA-48

7.4.3 Séquençage et analyse des séquences des gènes qui codent pour les BLSE et carbapénémases

Tableau 35: Profile phénotypique et moléculaire des *K. pneumoniae* carba R

Isolats	MIC ERT	MIC IMP	tests Phénotypiques		gènes de résistance aux antibiotiques
	(mg/L)	(mg/L)	MHT	MCNP	
KP-01	>32	2	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-02	>32	2	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-03	>32	1.5	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-04	>32	1	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-05	>32	3	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-06	>32	3	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-07	>32	4	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-08	>32	4	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-09	>32	3	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-10	>32	4	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-11	4	8	+	+	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-25	3	8	+	+	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-30	>32	3	+	+	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
KP-42	3	8	+	+	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}

MIC, Minimum inhibitory concentration; ERT, Ertapenem; IMP, Imipenem; MHT, Modified Hodge test; MCNP, Modified Carba NP

Après la révélation des bandes d'ADN sur gel d'agarose par électrophorèse sous UV, la 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 ARG-ANNOT software, nous avons identifié deux variants du gène *bla_{SHV}* (SHV-1 et SHV-12). Ces techniques ont également révélé que tous les gènes *bla_{TEM}* appartenaient au variant TEM-1 et que tous les gènes *bla_{CTX-M}* appartenaient au variant CTX-M-15 du groupe 1. Par ailleurs, les 11 souches de *K. pneumoniae* et la souche d'*E. cloacae* résistantes portent toutes le gène *bla_{OXA-48}* et pour les 3 souches de *K. pneumoniae* portent le gène *bla_{KPC-2}*. Les résultats sont consignés dans le tableau 36

7.5 Le typage moléculaire

7.5.1 Le biotypage par MALDI-TOF-MS

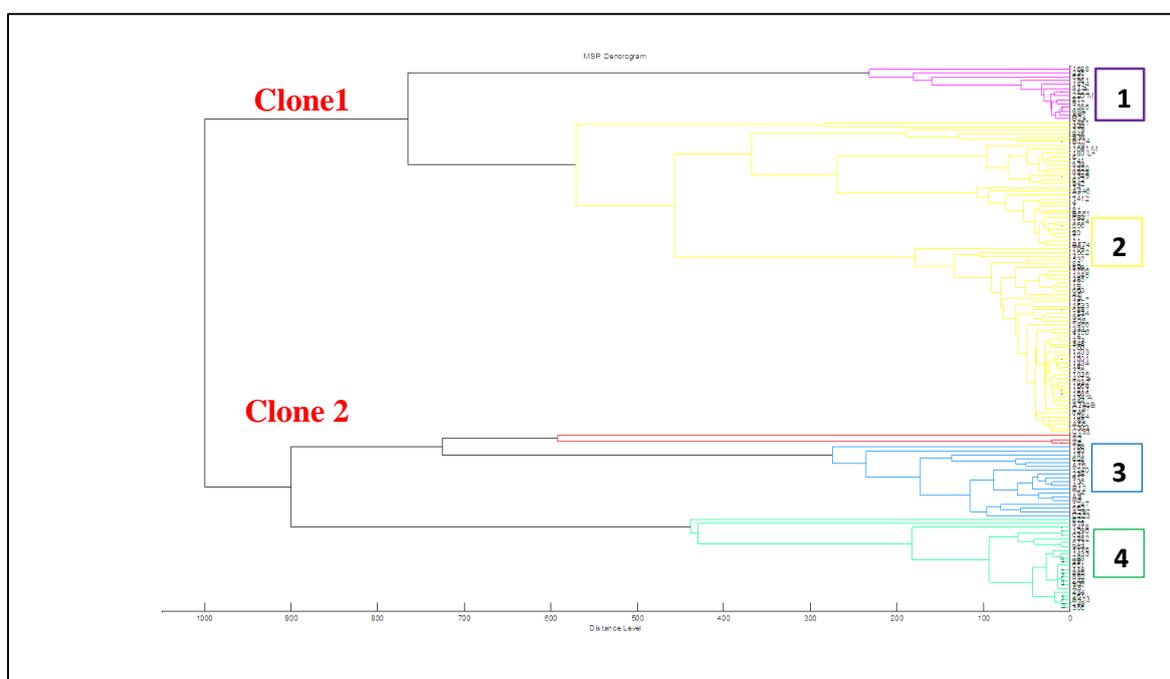


Figure 64: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des Enterobacteries

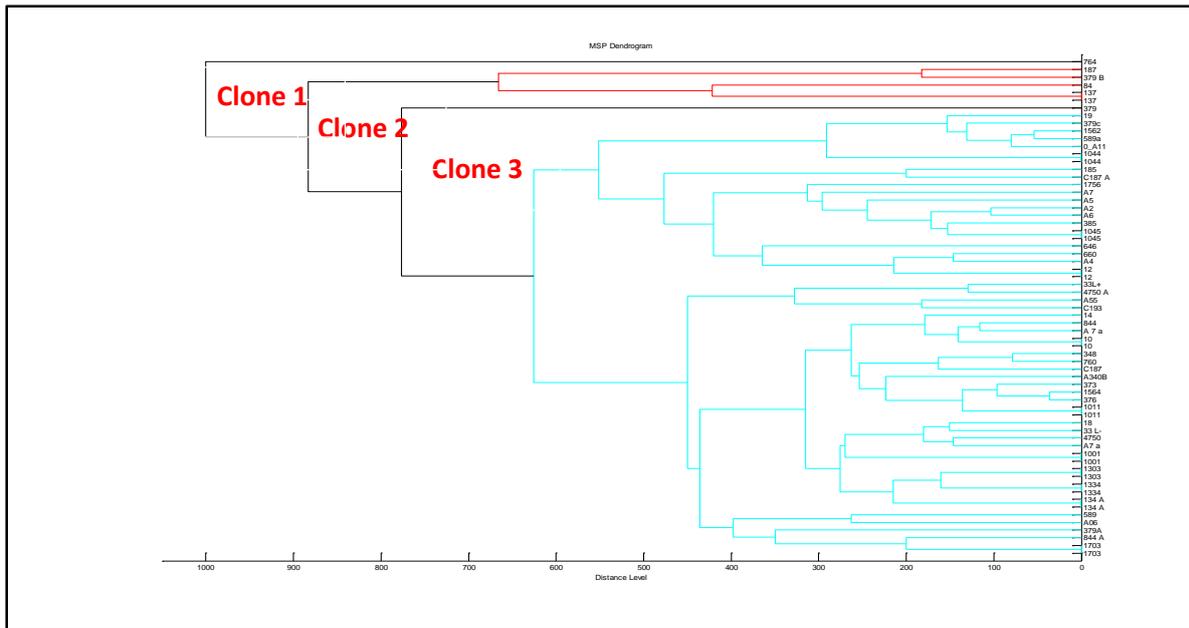


Figure 65: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des *K. pneumoniae*

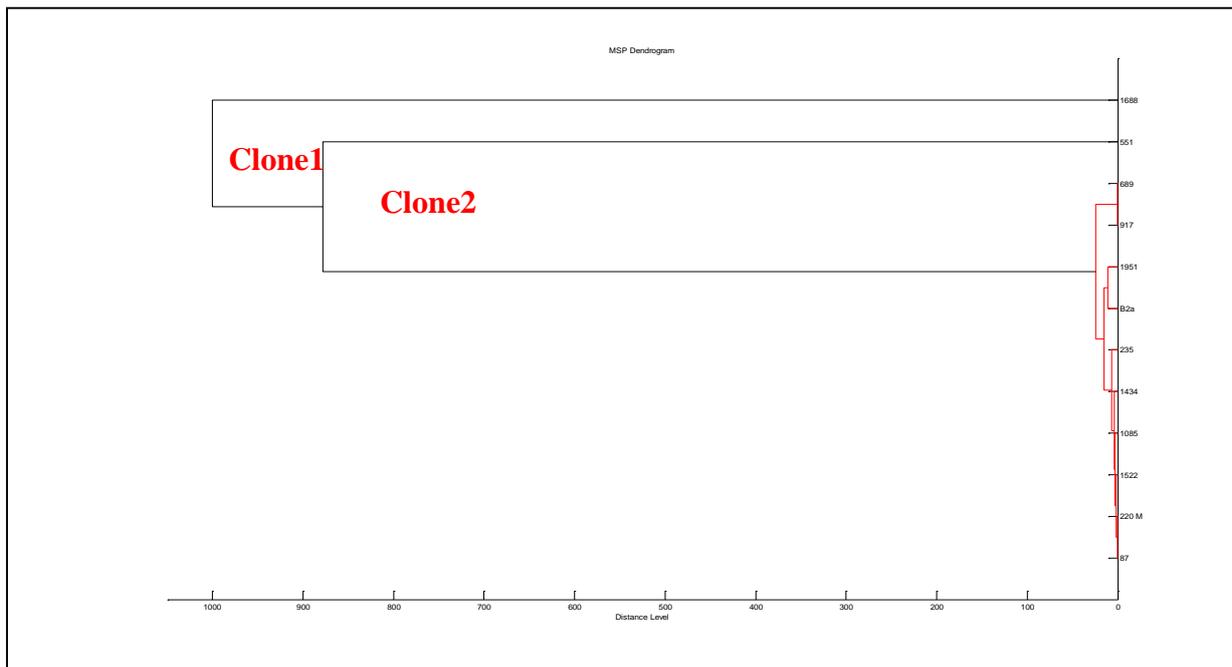


Figure 66: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des *M. morgani*

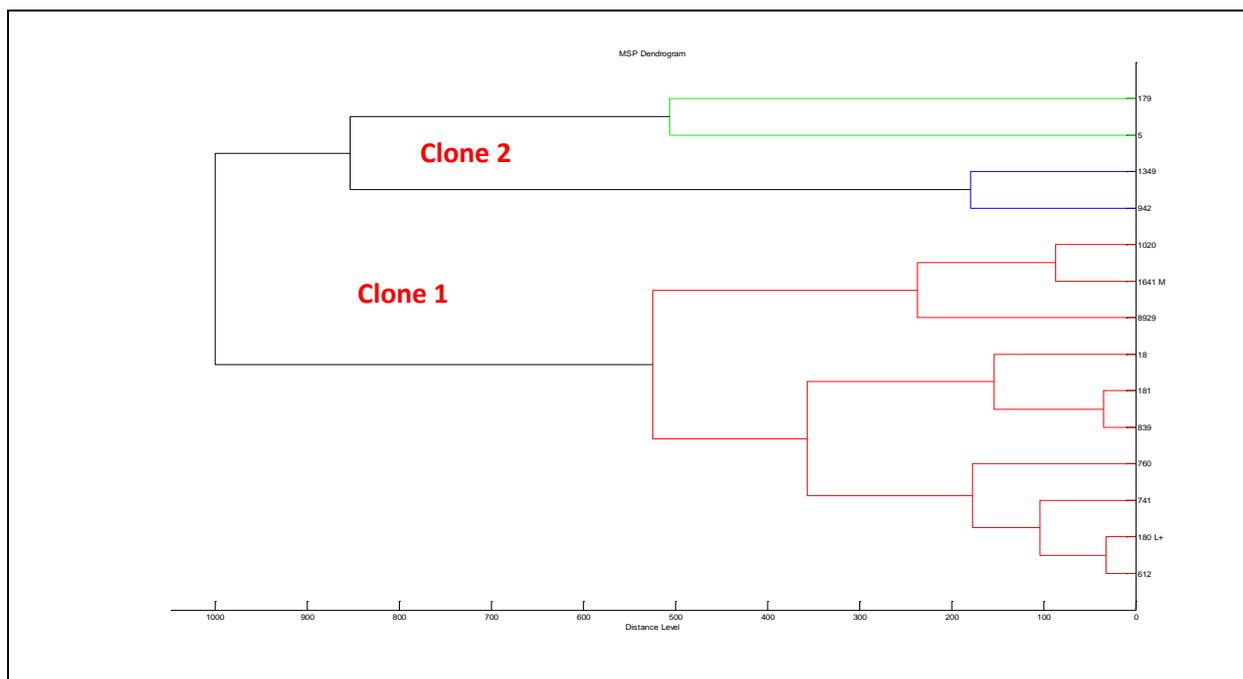


Figure 67: Dendrogramme MSP (Mean spectra projection) des *E.coli*

A partir des spectres obtenus lors de l'identification des souches par MALDI TOF-MS, des dendrogrammes ont été réalisés pour différentes espèces d'entérobactéries, en comparant les spectres des profils protéiques des bactéries obtenues avec les spectres présents dans la banque de données du MALDI grâce au logiciel Bruker Biotyper software 3.0. Cette comparaison nous a permis d'avoir un aspect épidémiologique des souches qu'on a étudié. Les souches qui se regroupent dans un même cluster traduisent la présence d'une probable épidémie dans le service.

Dans notre étude, le résultat du dendrogramme a révélé que nos souches d'enterobacteries se regroupent en 2 clones :

Clone 1 : qui regroupe les souches *M.morgannii* (1) et *K. pneumoniae*(2)

Clone 2 : qui regroupe les souches des *E.cloacae*(3) et des *E.coli* (4)

Les résultats du dendrogramme des enterobacteries, des *K. pneumoniae*, *M.morgannii* et *d E.coli* 'sont illustrés par les figures ci-dessous (64, 65, 66,67)

7.5.2 Génomique par la méthode "Multi-locus séquence typing" (MLST)

Tableau 36: Les STs des *K. pneumoniae* Carba-R

Isolats	Date de prélèvement	Gènes de résistance aux antibiotiques	MLST
KP-01	13/01/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-02	27/01/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-03	05/03/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-04	19/03/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-05	07/06/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-06	19/06/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-07	19/06/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-08	28/06/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-09	01/08/2015	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-10	12/01/2016	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-11	29/03/2016	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	258
KP-25	03/02/2017	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	258
KP-30	02/08/2017	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-42	14/09/2017	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	258

La recherche de la relation clonale entre les 14 souches de *K.pneumoniae* a été effectuée par l'amplification par PCR standard des 7 gènes de ménage de cette espèce (*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 obtenues à partir des 7 locus sélectionnés permet de définir une séquence type (ST) pour chaque souche. Selon l'analyse MLST deux ST différentes étaient attribuées aux 14 souches de *K.pneumoniae*, y compris ST 101 et ST 258. Le ST le plus couramment identifié (ST101) était détecté dans 11 isolats de *K.pneumoniae* producteurs d'OXA-48, alors que ST258 a été identifié dans les 3 KPC-2 produisant *K.pneumoniae*. Les résultats sont présentés dans le tableau 18

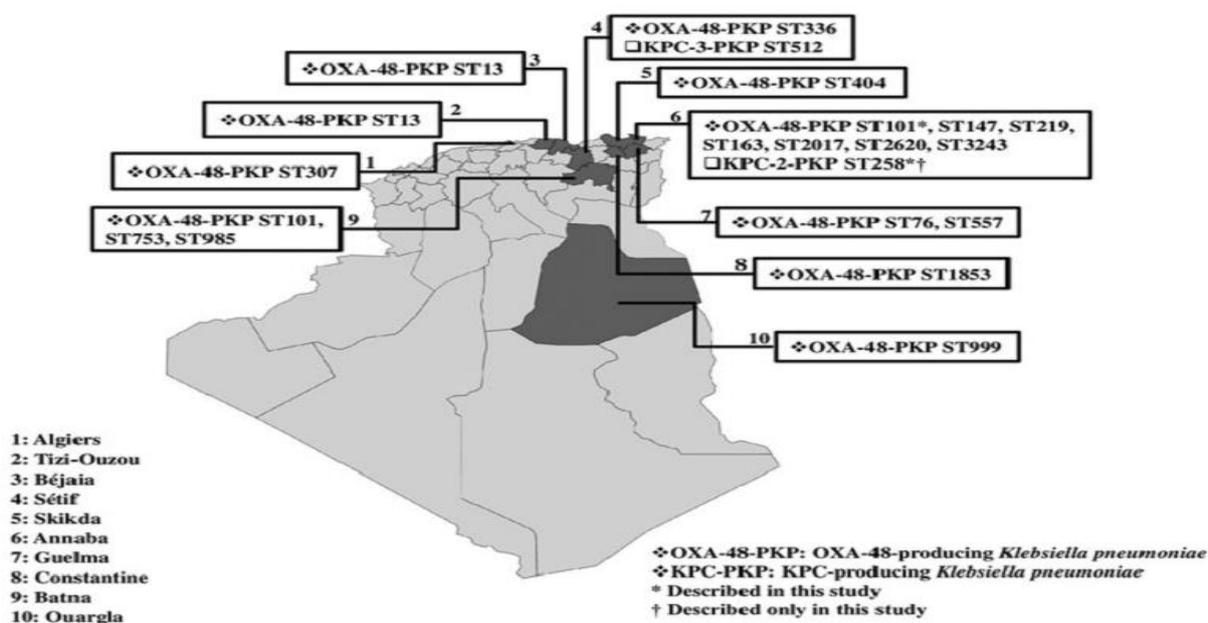


Figure 68 : Répartition du *Klebsiella pneumoniae* produisant de l'OXA-48 et du KPC identifié dans différents hôpitaux algériens.

7.6 Transfert par conjugaison et transformation

Aucun transconjugant ou transformant n'a été obtenu pour les 14 isolats de *K.pneumoniae* résistants aux carbapénème. Cependant, des amplifications par PCR pour les gènes des carbapénèmases *bla KPC* et *blaOXA-48* réalisées sur des plasmides extraits purifiés (PCR du gène ARNr 16S négatif) a montré des résultats positifs pour tous les isolats testés, suggérant que les deux gènes de carbapénèmases étaient probablement portés par les plasmides.

Discussion

La fréquence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques a atteint, partout dans le monde, des proportions inquiétantes sont devenue un problème majeur de santé publique.

Les carbapénèmes sont un groupe des β -lactamines qui sont souvent utilisés comme antibiotiques de dernier recours pour le traitement d'infections dues à des bacilles à Gram négatif multirésistants. Ils sont également stables, même en présence de BLSE et β -lactamases AmpC, toutefois, ce scénario a changé avec l'apparition au cours des dernières années, des bactéries résistantes aux carbapénèmes principalement chez les bacilles à Gram négatif qui comprennent les entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

L'analyse de la littérature a rapporté plusieurs facteurs de risque d'acquisition de ces bactéries multi-résistantes dans les hôpitaux, dont la plupart sont des facteurs individuels qui échappent à l'intervention des soins médicaux tels que les maladies associées et la gravité de l'état clinique des patients à l'admission, leur âge et leur sexe.

De ce fait, pour contrôler cette évolution et tenter de prévenir ces complications, l'objectif de notre travail a été axé sur la caractérisation des bactéries isolées des patients hospitalisés dans le service d'urologie de l'hôpital Ibn Roched CHU d'Annaba.

On s'entreprind de déterminer les profils et les niveaux de résistance aux antibiotiques des bactéries isolées. Au cours de notre récolte, un intérêt particulier a été porté à la recherche de résistance vis-à-vis des carbapénèmes, pour les bacilles à Gram négatif.

Le point de départ de ce travail consiste à réaliser une enquête épidémiologique, d'évaluer l'incidence et la prévalence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, pour entamer dans une seconde étape, la mise en évidence des phénotypes de la résistance. Ainsi, il nous a paru nécessaire d'approfondir les connaissances relatives aux mécanismes biochimiques de la résistance aux β -lactamines des bacilles à Gram négatif résistant aux carbapénèmes, tout en essayant d'identifier les supports génétiques pouvant être à l'origine du phénomène, en mettant l'accent sur la clonalité de ces souches bactériennes.

- Identification des souches

L'identification des souches a été réalisée pour la 1^{ère} étape par API20(NE ou E) ensuite la confirmation par le MALDI-TOF MS, ce dernier a donné un très bon score d'identification pour toutes les espèces étudiées. L'ensemble des publications confirme le rôle des systèmes MALDI-TOF MS comme outil d'identification de première ligne dans un laboratoire de routine, mais insiste également sur l'importance des mises à jour de la base de données (Descy et al. 2010). Cette étude a permis de diviser les bacilles à Gram négatif en : Entérobactéries 83/114 (72.80%), et les Bacilles à Gram négatif non fermentants 31/114(27.19%). Donc c'est une nette prédominance de la famille des Enterobacteriaceae. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus au Maroc(Elouennass et al. 2008), en France (Zogheib et Dupont 2005)et au Cameroun(Piéboji et al. 2004), contrairement, les études de Sefraoui, Dali, Mesli et Zenati, ont montré une prédominance des BGN-NF.(Mesli et al. 2013; SEFRAOUI 2015; Zenati et al. 2016). L'identification des espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae dans notre étude a dévoilé que *Klebsiella pneumoniae* prédomine avec un taux 54% (45/83). Nos résultats sont comparables à ceux retrouvés dans la littérature, Atena (Amiri et al. 2016), Wolf (Wolf et al. 2001) et discordantes avec l'études de Turmel Jean-Marie (Turmel 2014) et El mahi Fadoua(El MAHI 2013)et Lahlou Amine(Lahlou Amine, Chegri, et L'Kassmi 2009) qui ont montré que *E.coli* était l'espèce la plus fréquemment isolée.

Pour les bacilles à Gram négatif non fermentants : *A. baumannii* représentait le germe le plus fréquemment isolé 67% (21/31), contrairement, les études Touati, Meradji, Sefraoui, Mesli, Bakour et Zenati ont montré que *P. aeruginosa* représente le germe le plus fréquemment isolé.(Sofiane Bakour et al. 2012; Meradji et al. 2015; Mesli et al. 2013; Sefraoui et al. 2014; A. Touati et al. 2012; Zenati et al. 2016).

- Prévalence des souches :

Dans notre étude, une prédominance masculine (60%) est constatée dans la distribution de la population d'étude, lorsqu'on mettait une sonde urinaire à des hommes et à des femmes hospitalisés, l'infection nosocomiale survenait beaucoup plus tôt chez l'homme que chez la femme et peuvent aussi s'expliquer par les propriétés antimicrobiennes des sécrétions prostatiques chez l'homme (Caron 2003). Nos résultats sont comparables à ceux retrouvés à Oran et à l'étude internationale EPIC II de Vincent et al. (Vincent et al. 2009). Contrairement à notre étude Mellouk a montré, une prédominance féminine (63%) et que les femmes ont plus de risque à développer une infection urinaire, ceci peut s'expliquer par la brièveté de l'urètre

féminin et les rapports sexuels qui favorisant la progression des bactéries urétrales dans la vessie. (Mellouk *et al.* 2017).

Les adultes sont la tranche la plus touchée par les infections, dans notre étude 52 allants de 40 à 60 ans (48%), 36 plus de 60 ans (28%) et 26 allants 20 à 40 ans (24%). Les interventions chirurgicales des personnes âgées font désormais partie du quotidien des services hospitaliers. Le grand âge est un facteur de risque car le vieillissement entraîne une lente dégradation des fonctions de l'organisme, le corps perd sa capacité à s'adapter aux agressions. Avec l'âge, on voit aussi augmenter la fréquence de l'athérosclérose, de l'hypertension, de l'insuffisance rénale... Des pathologies qui peuvent se combiner, interagir entre elles, et donc compliquer la prise en charge chirurgicale et imposer encore plus de vigilance. (Caron 2003; Wary et Villard 2006).

Sur les 114 prélèvements ; les prélèvements des urines de sonde jj et les prélèvements des pus étaient pratiques dans 45 % et 35 % des cas respectivement, suivis par les urines dans 17% cas. Ceci peut être expliqué par le nombre important des patients porteurs des sondes dans le service d'urologie et que la fréquence d'acquisition d'une bactériurie augmente de 5% avec chaque journée de sondage selon MALLARET (Mallaret *et al.* 1998) . Pour les prélèvements de pus leur fréquence peut être expliquée par la nature chirurgicale du service et la présence des infections du site opératoire.

- **La résistance aux antibiotiques :**

La résistance bactérienne aux antibiotiques est l'un des problèmes de santé publique mondiaux les plus graves. De nombreuses espèces responsables des maladies infectieuses ne réagissent plus aux antibiotiques courants. Compte tenu de la gravité du problème, si des mesures concertées ne sont pas prises à l'échelle mondiale, nous risquons de revenir à l'ère pré-antibiotiques.

La connaissance de la situation locale et de l'évolution de la résistance aux antibiotiques sont nécessaires pour le choix de l'antibiothérapie de première intention (El Bakkouri *et al.* 2009). Le premier fait marquant de notre étude est le taux de résistance élevé aux différentes classes d'antibiotiques testées ainsi que la diversité de phénotypes de résistance vis-à-vis des β -lactamines.

La résistance des BGN aux antibiotiques pose un grand problème au niveau des hôpitaux algériens et dans le monde entier (Van Duijn, Dautzenberg, et Oostdijk 2011) surtout après la grande diffusion des clones résistant aux C3G qui ne cesse de se renforcer notamment par

l'acquisition de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) (Baba Ahmed-Kazi Tani et al. 2013; Belmonte et al. 2009) et la propagation des clones résistant aux carbapénèmes par l'acquisition de β -lactamases de type carbapénémases qui sont des enzymes les plus puissantes que les BGN ont pu produire.(Djahmi *et al.* 2014; Mathlouthi *et al.* 2016; Patrice Nordmann 2014).

- **Les bacilles à Gram négatif non fermentants :**

L'*A. baumannii* et *P. aeruginosa* sont devenus des pathogènes nosocomiaux importants qui s'adaptent facilement à l'environnement hospitalier et sont capables d'acquérir une résistance à presque tous les antibiotiques actuellement utilisés, y compris les carbapénèmes qui ont été le médicament de choix contre ces agents pathogènes(Kempf *et al.* 2013). Les isolats de notre collection ont présenté une résistance remarquable aux C3G et à l'imipénème pour la majorité. Le nombre d'isolats résistants à l'imipénème a augmenté considérablement dans le monde et même en Algérie.

La résistance chez *A. baumannii* ne cesse d'évoluer et il y a une grande diffusion de la résistance à l'imipénème chez cette espèce en Algérie, 47.9% à Tizi-ouzou et Sétif (Sofiane Bakour et al. 2013), 100% à Alger, Sétif et Bejaia (Sofiane Bakour et al. 2014),80-91,3% à Annaba (Abir Ramoul *et al.* 2016; A. Touati *et al.* 2012). En France 100% d'*A. baumannii* isolées à Marseille ont été résistants à l'imipénème(Kempf et al. 2013) , 88% en Lybie (Mathlouthi *et al.* 2015), 69% en Jordanie (Obeidat *et al.* 2014).

Dans notre étude, les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*A. baumannii* isolées, ont révélé une forte résistance à presque tous les antibiotiques testés tel que les β -lactamines, les aminoglycosides et les quinolones à l'exception de la colistine, la résistance à l'Imipénème a été confirmée par E-test qui montre des résultats positifs pour toutes les souches.

Les souches d'*A.baumannii* résistante à l'imipénème, soit en raison de la diminution de la perméabilité de la paroi, soit à la suite d'une altération des PLP, soit par production d'une bêtalactamase hydrolysant l'Imipénème (Ait El Kadi *et al.* 2006; Annie, Vessières, et Scavizzi 1996).

Notre étude a montré une multirésistance d'*A. baumannii* aux différents antibiotiques, ainsi la molécule la moins efficace de notre étude, est la Rifampycine 5 % , suivit de 90-100% aux (Ticarcline, Ticarcline-acide clavulanique, la Céftazidime,pipéracilline-tazobactam,la céfépime la Gentamicine, la Ciprofloxacine, la Triméthoprime/ sulfaméthoxazole) et une sensibilité totale à la colistine. Nos souches restent plus résistantes que des souches isolées en Maroc entre 2003 et 2005 (91 % à la Céftaxime, 50,3 % à la Ceftazidime et 42,6 % à

l'Imipénème, les Aminosides varient de 17,9 % pour la Nétilmicine à 72,1 % pour la Gentamicine, la Ciprofloxacine était de 65,8 % et au Triméthoprimé–sulfaméthoxazole de 75,8 %)(Lahsoune et al. 2007). D'autres études en Asie, Europe de l'Est et en Tunisie sont similaires aux résultats de notre étude (Van Looveren et Goossens 2004; L. Poirel et Nordmann 2006; Trabelsi *et al.* 2014).

Pour ce qui est du *P. aeruginosa*, la résistance à l'imipénème a été très remarquable, dont la totalité des *P. aeruginosa* isolées des patients avec un taux de 100%. Ce taux reste le plus élevé à l'échelle nationale, dont un taux de 50% a été rapporté à Annaba (M. Touati 2013), 21,7% et 32,9% à Oran (SEFRAOUI 2015). En Europe, le taux est aussi faible avec 17,1% (Thibault 2011), en revanche, le taux de résistance est élevé en Lybie avec 87% (Mathlouthi *et al.* 2015) et au Liban avec 100% (Al Bayssari *et al.* 2014). Notre travail a montré une résistance moyenne aux β - lactamines, avec un taux de 100% pour imipénème qui est considéré comme l'antibiotique de choix pour traiter les infections causées par ce germe.

Cette résistance est souvent liée à une perte de la porine D2 (OprD) et couplée à une faible hydrolyse par la céphalosporinase périplasmique, soit par production d'une bêtalactamase hydrolysant l'Imipénème, peut être expliquée par la forte consommation de l'imipénème dans nos hôpitaux, où ce composé est prescrit pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*.

- **Les entérobactéries :**

Le premier fait marquant de notre résultat pour les entérobactéries est le taux de résistance à l'Ertapénème et l'imipénème chez les quatorze souches de *Klebsiella pneumoniae* 16.86%.

Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont été rapportées avec une fréquence croissante dans le monde depuis la première description de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases aux États-Unis à la fin des années 1990. La plus forte endémicité se situe aux États-Unis, en Grèce, et dernièrement en Italie et en Inde (Patrice Nordmann 2014). La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes demeure rare en Algérie, les premiers cas ont été décrits, en 2013 à Annaba chez *E. coli* (Sassi *et al.* 2013). En 2014 aux hôpitaux de Constantine et d'Alger respectivement chez *E. coli* et *K. pneumoniae* (Agabou et al. 2014; Aggoune *et al.* 2014). En 2015, une seule étude a été rapportée sur *K. pneumoniae* aussi à Constantine (Cuzon *et al.* 2015). En 2016, trois autres études ont été publiées, à Batna, Loucif et al. ont rapporté un autre cas de *K. pneumoniae* (Loucif *et al.* 2016), , à Guelma, Bouguenoun et al., ont rapporté également des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ertapénème) dont *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*, (Bouguenoun *et al.* 2016). en 2017, à Annaba et Skikda, Mellouk et al., Abderrahim et al, ont rapporté d'autres espèces, en plus de

K.pneumoniae et *E. coli*, *E. cloacae* et *S. marcescens* ont aussi présenté une résistance aux carbapénèmes et plus précisément à l'ertapénème (Mellouk *et al.* 2017; Abderrahim *et al.* 2017) Dans notre étude, on a isolé 14 (17%) *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes, la méthode biochimique de carba NP test qui s'avère être la méthode phénotypique à la fois la plus sensible et la plus rapide (la lecture après 2H) et possède aussi une excellente spécificité (L. Dortet, Poirel, et Nordmann 2013; Laurent Dortet, Poirel, et Nordmann 2012). Le résultat de ce test a été positif pour 14 *Klebsiella pneumoniae*, en plus une autre méthode a été aussi utilisée, le test de Hodge modifié qui montre des résultats positifs aussi pour les 14 *K. pneumoniae*. Les résultats de notre étude concernent les méthodes phénotypiques similaires à plusieurs études qui ont utilisé ces méthodes pour la confirmation de la présence des entérobactéries productrices des carbapénèmases (Dortet *et al.*, 2014; Essayagh *et al.*, 2012; Girlich *et al.*, 2012; Jolivet-Gougeon *et al.*, 2011; Mennane *et al.*, 2016; Nordmann, 2014; Riethmuller, 2013.)

Les entérobactéries résistantes aux C3G occupent une place importante dans les infections nosocomiales. Dans notre étude, la majorité voir la totalité des isolats, présentaient une résistance vis-à-vis des C3G testés (plus de 90%). Ces hauts niveaux de résistance étant considérés les plus élevés en Algérie par rapport à ceux retrouvés au CHU de Tlemcen (A. Touati *et al.* 2012; 2007), et comparable à ceux retrouvés en Tunisie (Boubaker *et al.* 2004) et en France (Kac *et al.* 2004; Masterton et Turner 2006).

Cependant, on note que le nombre des souches productrices de BLSE dans notre étude est très élevé (68/83) avec un taux de 83%. Ce taux reste supérieur à celui retrouvé à l'échelle nationale, à Tlemcen (A. Touati *et al.* 2012; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.* 2013), et à Annaba (Nedjai *et al.* 2012), même en Tunisie (Messai *et al.* 2008). Concernant les autres antibiotiques, nos résultats ont indiqué que la majorité des entérobactéries étaient résistantes à l'Amoxicilline et l'Amoxicilline + Acide clavulanique. Cette résistance est due à la production de céphalosporinase chromosomique. Les taux de résistance au céftriaxone pour les entérobactéries varient entre (91% et 100%), pour céfipime entre (33% et 100%). Ces taux de résistance sont expliqués par la production de BLSE grâce à l'observation de bouchon de champagne ou entonnoir dans le test de synergie chez 68 souches sur 83 (83.13%) (31 *K. pneumoniae*, 14 *E. coli*, 11 *Enterobacter cloacae*, 12 *Morganella morganii*).

Cependant, on note que 100% des *M. morganii* et *E. coli* isolées dans notre étude, ont été résistantes aux C3G et présentaient le phénotype de BLSE, ces résultats sont les plus élevés par rapport à ceux retrouvés dans d'autres études nationales sur *E. coli* (A. Touati *et al.* 2012; A. Ramoul 2013; Sassi *et al.* 2014).

K. pneumoniae, qui représente l'espèce la plus isolée dans notre étude, vient en 2ème place par rapport à la résistance aux CRO avec 96% des cas, dont 68% du total des souches, ont présenté un phénotype BLSE. Ce résultat reste dans le cadre des taux retrouvés dans les études algériennes sur les souches cliniques avec 68.3% à Tlemcen (Berrazeg *et al.* 2013), 80% et 79.16% à Annaba (Belbel *et al.* 2014; Labid *et al.* 2014), un taux plus élevé a été retrouvé à Annaba (91.3%) (A. Ramoul 2013), contrairement au taux très faible retrouvé au Maroc (Barguigua *et al.* 2011)

Une multirésistance aux autres antibiotiques est également observée pour les entérobactéries résistantes aux B-lactamines, La ciprofloxacine et les aminosides ont montré également une très bonne activité (ciprofloxacine 83 et 100%, Gentamicine entre 16 et 64%, Amikacine entre 13 et 42% avec une sensibilité totale pour *Morganella morganii*). Cependant plusieurs publications ont rapporté des taux de résistance variables à ces molécules : 55% des souches sont résistantes à la ciprofloxacine dans l'étude rapportée par (Guessenn *et al.* 2008), 14% rapportés par Thabet (THABET *et al.* 2010) pour les aminosides.

Les options thérapeutiques sont donc limitées devant des infections nosocomiales impliquant des BGN résistants aux C3G et/ou aux carbapénèmes, et d'une manière générale aux β -lactamines qui ont été considérés comme traitement de choix au niveau des hôpitaux. Malheureusement, leur utilisation massive même pour des raisons prophylactiques n'était pas sans conséquences. En revanche, les autres classes d'antibiotiques telles que les aminosides, les quinolones, la fosfomycine, triméthoprimes-sulfaméthoxazoles et la colistin, peuvent être le traitement de secours pour ces isolats, malgré la toxicité de quelques molécules. Des résistances croisées ont été observées dans notre étude comme dans d'autres études à l'échelle nationale et internationale, qui ont prouvé la présence fréquente de co-résistances entre les β -lactamines et les différentes classes d'antibiotiques rendant les bactéries multi-résistantes (Leotard et Negrin 2009). Cette résistance pourrait être due à des modifications (dites mutations) des porines, associée à la production de β -lactamases (J. W. Bennett *et al.* 2010).

La colistine reste active et la résistance à cet agent antimicrobien reste marginale et classiquement faible. Dans notre collection, aucune souche n'a été résistante à la colistine.

- **Etude moléculaire :**

Devant ces taux très inquiétants de résistance, la dissémination des BGN multirésistants surtout aux β -lactamines ainsi que l'émergence d'entérobactéries de résistances (dites rares) aux carbapénèmes, il était impératif de rechercher les supports génétiques de cette résistance. De ce fait, à partir des résultats de l'antibiogramme et de l'analyse phénotypique des BGN de notre collection, 45 souches résistantes aux carbapénèmes (14 *K. pneumoniae*, 21 *A. baumannii* et

10 *P. aeruginosa*) ont été ciblées pour l'étude des supports génétiques de la résistance aux β -lactamines.

Il y a un peu plus de 20 ans, la première classe de A *K. pneumoniae* (KPC) produisant de la carbapénémase a été détecté en Caroline du Nord, aux États-Unis d'Amérique, et depuis lors, ces isolats se sont répandus dans le monde entier et deviennent endémiques dans certains pays.(Porres-Osante *et al.* 2014), notamment en Europe, en Amérique du Sud, au Moyen-Orient (Saidel-Odes et Borer 2013)et en Afrique(Brink *et al.* 2012).

Le premier isolat clinique avec une β -lactamase KPC détecté en France était un *K. pneumoniae* positif pour KPC-2 trouvé en 2005. Il a été récupéré à partir d'hémocultures d'urine et de sang d'un patient qui avait été admis à l'hôpital 3 mois plus tôt à New York. (New York, États-Unis).(Munoz-Price *et al.* 2013) . En Italie, Giovanni Sotgiu et al ont signalé des souches KPC-2 isolées chez un patient atteint d'infections invasives dans un hôpital universitaire italien en 2018.(Sotgiu *et al.* 2018) Au Brésil, Leonardo Neves Andrade et al ont décrit l'isolat KPC-2 de quatre grands hôpitaux en 2017.(Andrade *et al.* 2018).

En Algérie, la détection de l'enzyme carbapénémase KPC (Variante KPC-3) a été signalée pour la première fois par Bakour en 2014. (S. Bakour, Sahli, *et al.* 2015). En effet, cette enzyme a été identifiée dans *K. pneumoniae* isolé chez un enfant de 6 mois atteint d'hydrocéphalus admis au service de neurochirurgie du Hôpital universitaire de Sétif Algérie(S. Bakour, Sahli, et al. 2015). Depuis lors, plus des études ont rapporté la détection du gène *bla_{KPC}* chez *K. pneumoniae* isolats cliniques. En 2019, Gharout-Sait et al. ont signalé le deuxième cas d'infection à *K. pneumoniae* productrice de KPC-3 dans des isolats non cliniques (chez le guano de chauve-souris) à La grotte d'Aokas de Bejaia, Algérie .(Gharout-Sait *et al.* 2019). Cette étude rapporte la deuxième détection du gène *bla_{KPC}* chez *K. pneumoniae* isolats cliniques et première détection du gène *bla_{KPC-2}* variante de *K. pneumoniae* isolée de patients hospitalisés à l'hôpital algérien.

Notre étude menée sur des patients hospitalisés dans le service d'urologie de l'hôpital d'Annaba (nord-est de l'Algérie), trois souches avec un niveau élevé de résistance aux antibiotiques (presque tous les antibiotiques testés sauf la fosfomycine, la doxycycline, triméthoprime – sulfaméthoxazole et colistine) ont été isolés. L'étude des déterminants de la résistance au β -lactame a montré que ces trois souches étaient résistantes en produisant quatre enzymes, y compris KPC-2, CTX-M-15, SHV-12 et Enzymes TEM-1.

En plus des enzymes KPC, un autre type d'enzymes carbapénémases a été identifié dans nos souches, à savoir Oxacillinase OXA-48. En effet, 11 des 14 *K. pneumoniae* les souches étudiées

se sont révélées résistantes à tous les b-lactamines antibiotiques testés, sauf imipénem. La caractérisation moléculaire de la résistance au b-lactame a montré que ces souches étaient résistantes avec la production de plusieurs enzymes, y compris OXA-48, CTX-M-15, SHV-1 et TEM-1. En 2001, la carbapénémase OXA-48 a été identifiée pour la première fois dans un isolat clinique de *K. pneumoniae* à hôpital universitaire de l'Istanbul, des voies urinaires d'un homme de 54 ans (Patrice Nordmann et Poirel 2014). Depuis lors, il a été largement identifié dans de nombreuses parties du monde, y compris européennes (Pays-Bas, France, Royaume-Uni, Allemagne, Italie, etc.) et Pays africains (principalement le Maroc, la Tunisie, l'Égypte et Libye) (Djahmi *et al.* 2014). En 2014, Aggoune *et al.* a rapporté le premier cas clinique de *K. pneumoniae* produisant de l'OXA-48 en Algérie chez un patient Hospitalisé dans une unité pédiatrique d'Hôpital militaire centrale Alger. (Aggoune *et al.* 2014) . Depuis, la production d'OXA-48 *K. pneumoniae* sont endémiques dans ce pays et Largement identifié dans différentes niches écologiques. (A. Touati et Mairi 2020). À Date, 12 études ont rapporté la détection d'OXA-48- Produisant *K. pneumoniae* dans des échantillons humains récupérés de différentes villes algériennes, dont Alger, Bejaia, TiziOuzou, Constantine, Skikda, Annaba, Batna, Guelma, Sétif (situé au nord-est de l'Algérie) et Ouargla (situé au nord-est de l'Algérie, plus précisément au nord du Sahara algérien) (Aggoune *et al.* 2014; Mellouk *et al.* 2017; Nabti *et al.* 2020; H. Yousfi *et al.* 2019).

Une étude précédente a révélé que 89% des isolats hébergeant *bla*OXA-48, sont productrice de BLSE (Potron *et al.*, 2013). En effets, cette étude supporte nos résultats de la coproduction de BLSE (CTX-M-15, SHV-1 and TEM-1) chez les *Klebsiella pneumoniae* productrice d'OXA-48.

-La recherche bibliographique nous a montré que beaucoup d'études nationales et internationales ont été faites sur *A. baumannii* productrice de carbapénémases, soit celles isolées des patients , dont les plus récentes en Algérie ont révélé une diversité d'enzymes, duquel on cite, OXA-23 et OXA-58, décrites par Touati *et al.*, OXA-23 par Ramoul *et al.*, OXA-23-like, OXA-24-like et OXA-72 ainsi que OXA-23 et NDM-1 cité par Bakour *et al.* et Mellouk *et al.*, (S. Bakour, Garcia, *et al.* 2015; Sofiane Bakour *et al.* 2012; Mellouk *et al.* 2016; A. Ramoul 2013; A. Touati *et al.* 2012).

Les études internationales ont été aussi importantes que celles à l'échelle nationale (Figueiredo 2011; Kirkgöz *et Zer* 2014; Mathlouthi *et al.* 2015).

Dans notre étude, 21 *A. baumannii* résistantes à l'imipénème, une souche héberge le gène *bla_{OXA-24}* et une contient *bla_{OXA-58}* alors que dix souches possèdent le gène *bla_{OXA-23}*. Nos résultats sont comparables avec ceux de la littérature.

Malheureusement, l'analyse moléculaire par la technique de PCR et le séquençage des sept gènes de ménage d'MLST dans notre étude, a été réalisée que pour les 14 souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes et qui ont subi une étude moléculaire des gènes de résistance.

Typage moléculaire :

Le typage moléculaire de 14 souches de *K. pneumoniae* a été réalisé par le *multi-locus sequence type* (MLST). Notre étude a révélé également la première découverte de ST258 en Algérie chez *K. pneumoniae*.

A ce jour, le gène *bla_{KPC}* a été associé à plus de 100 ST, mais la situation pandémique a principalement de la propagation de *K. pneumoniae* produisant des KPC appartenant au groupe clonal 258 (CG258). Ce CG258 est principalement composé du clone prédominant ST258 et de son dérivé clones ST512, ST11 et ST340.(Chen *et al.* 2014 ; Pitout, Nordmann, et Poirel 2015). En Algérie, les souches KPC productrices de *K. pneumoniae* détectées à ce jour appartiennent à un seul clone, ST512(S. Bakour, Sahli, et al. 2015; Gharout-Sait et al. 2019). Notre étude fournit la première description de *K. pneumoniae* ST258 produisant du KPC-2 dans ce pays.(Brahmia *et al.* 2021)

Les 11 souches de *K. pneumoniae* productrices d'OXA-48 isolées de nos patients ont été affectées à un seul clone, ST101 (tableau 18). Ce clone a été identifié comme un clone prédominant d'agents pathogènes nosocomiaux responsables d'épidémies en milieu clinique dans de nombreux pays méditerranéens, Y compris l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Libye.(Hashimoto *et al.* 2014). En Algérie, l'étude du type de clone est déterminé par MLST dans OXA-48- La production de *K. pneumoniae* a révélé la présence de Plusieurs clones (31 ST), 17 ST isolés dans des sources humaines (ST101 comme prédominant) et 14 ST isolés Dans des sources extrahumaines (ST13 étant la principale) .(Aggoune *et al.* 2014; H. Yousfi *et al.* 2019).

En raison de la propagation des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques causant des infections nosocomiales, la différence entre les isolats du même groupe bactérien, voire de la même espèce, doit être mise en évidence pour identifier les sources potentielles de contamination et de suivre la transmission entre les patients.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF MS nous a permis l'identification des bactéries par analyse de leurs protéines totales ainsi que l'identification intra-spécifique ou le typage des isolats (identification de souches au sein de la même espèce). Cependant, il s'agit aussi d'une méthode rapide et alternative pour une meilleure enquête épidémiologique de ces bactéries, en particulier pour l'émergence de clones spécifiques afin de mettre en œuvre des mesures rapides de lutte contre l'infection(Sofiane Bakour *et al.* 2012). À l'heure actuelle, certaines études portent sur la question de savoir qu'il est possible d'utiliser la MALDI-TOF comme outil discriminatoire pour le typage. En effet, il est déjà démontré qu'à l'aide de cet outil, le typage des isolats cliniques et environnementales est possible(Batah *et al.* 2015; Khennouchi *et al.* 2015; Mesli *et al.* 2013; Novais *et al.* 2014; Sachse *et al.* 2014).

L'analyse du dendrogramme était utile pour caractériser les souches des BGN en fonction de leur espèce. Les protéines ribosomales et protéines associées aux membranes a distribué 6 clusters dont chacun correspond à une espèce pour les enterobacteries. Un cluster des 12 souches de *M.morganii*, un cluster des 45 souches de *K. pneumoniae*, un cluster des 12souches *E. cloacae*, un cluster des 12 souches d'*E.coli*.

Ceci est cohérent avec les études récentes. Dans lesquelles les auteurs ont montré que la MALDI-TOF MS est capable d'identifier et classer les souches d'*Acinetobacter* spp. dans des clusters séparés(Mesli *et al.* 2013).

Il serait alors intéressant d'introduire cette technique et de l'appliquer en routine hospitalière, pour voir le lien protéique entre les souches.

Conjugaison et transformation

Dans la littérature, la propagation du gène de type *bla_{OXA-48}* est principalement la conséquence de la dissémination d'un plasmide épidémique IncL / M.(Potron, Poirel, et Nordmann 2014). De plus, le gène de type *bla_{OXA-48}* était généralement lié au transposon Tn1999.1(Lalaoui et al. 2019)ou à ses variants Tn1999.2(Sotgiu *et al.* 2018) et Tn1999.3 (C.-R. Lee *et al.* 2016; Machuca *et al.* 2019).

Concernant le *bla_{KPC}* Gène, il a souvent été détecté dans le transposon, appelé Tn4401, qui constitue la principale structure génétique qui a grandement contribué à la diffusion de ce gène de résistance sur différents plasmides.(Chen *et al.* 2014; Pitout, Nordmann, et Poirel 2015). Bien que les expériences de conjugaison et de transformation de *K. pneumoniae* produisant du KPC dans notre étude aient échoué, nous avons néanmoins pu identifier la présence du Gènes *bla_{OXA-48}* et *bla_{KPC}* sur des plasmides extraits. Ceci nous amène à conclure que, dans notre hôpital(CHU d'Annaba) , nous avons été témoin d'une dissémination d'un clone et non d'un plasmide, en particulier dans le cas des producteurs d'OXA-48, où, tout au long de la période

d'étude, toutes les Souches de *K. pneumoniae* productrices d'OXA-48 isolées dans le service d'urologie appartenaient au même clone ST101.

Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail, nous avons confirmé que la résistance aux antibiotiques, particulièrement en urologie, est devenue une préoccupation mondiale et constitue un problème majeur de santé publique. En effet, depuis ces dernières années, nous avons assisté à une augmentation fulgurante de la résistance aux antibiotiques. De nombreux antibiotiques disponibles contre des infections bactériennes courantes en urologie deviennent de plus en plus inefficaces. Les données de diverses études menées au cours de ces dernières années montrent des taux alarmants d'antibiorésistance des germes hospitaliers nécessitant une mise en place de mesures urgentes et durables pour la lutte contre l'infection acquise à l'hôpital. Ce sont donc des défis majeurs à relever afin d'éviter des situations inéluctables d'impasses thérapeutiques à venir.

En fait l'objectif de notre travail a porté sur l'identification et l'évaluation de l'antibiorésistance de 114 BGN : 83 : entérobactéries (73%), et 31 (27%) au groupe des bacilles à Gram négatif non fermentant durant la période du mois de janvier 2015 jusqu' au mois de décembre 2017, à partir de différents prélèvements cliniques provenant des patients hospitalisés dans le service d'urologie du CHU d'Annaba.

Cependant, les souches de la famille des Enterobacteriaceae ont été prédominées par *K. pneumoniae* (39%).

Concernant les BGN-NF, nous avons trouvé une dominance d'*A. baumannii* (67.74%)

Les taux alarmants de multirésistance bactérienne ont été enregistrés pour l'ensemble des souches isolées. La résistance des entérobactéries isolées est très inquiétante, presque la totalité ont été résistantes aux C3G avec un pourcentage élevé du phénotype de production de BLSE, les *E. coli* et *M.morganii* 100%,les *E. cloacae*(91.66%) et *K. pneumoniae* (68.88%).

Le taux de résistance à l'Ertapénème et l'imipénème chez les quatorze souches de *Klebsiella pneumoniae* 16.86% , ce taux est aussi remarquable, vue la rareté de ce phénotype en Algérie et la menace de la dissémination de cette résistance dans le monde. Pour les *A. baumannii* et *P. aeruginosa*, la résistance est à 100% à l'Imipénème.

En effet, ces résistances des BGN confèrent une résistance croisée à d'autres antibiotiques. Dans notre étude la résistance aux β -lactamines a été dans la majorité des cas, associé à des résistances aux aminosides et aux fluoroquinolones.

L'étude moléculaire par PCR et séquençage a indiqué la présence de plusieurs gènes de résistance : CTX-M-15, SHV-12, TEM-1, SHV-1 pour les BLSE, KPC-2 , OXA-48, OXA-23, OXA-24, OXA-58 pour le carbapénèmes.

L'utilisation des outils de biologie moléculaire et des logiciels de bioinformatique nous a permis la caractérisation des gènes de résistance aux carbapénèmes des quatorze *Klebsiella pneumoniae.*, dont nous rapportons pour la première fois la détection de *bla_{KPC-2}* dans trois souches de *Klebsiella pneumoniae*, et l'OXA-48 a été révélée dans les 11 souches *K. pneumoniae* restantes. Pour les OXA-23, OXA-24, OXA-58 ont été révéler dans *A. baumannii*.

Grâce à l'utilisation de la technique du MLST afin de rechercher la relation clonale entre les souches, nous avons pu révéler la première découverte de ST258 en Algérie dans trois souches *K. pneumoniae* productrices de KPC-2. Les 11 souches de *K. pneumoniae* productrices d'OXA-48 isolées de nos patients ont été affectées à un seul clone, ST101.

Nous avons aussi utilisé le MALDI-TOF MS révélant un rapprochement protéique des souches de la même espèce.

Nous pouvons ainsi dire, que ces souches multi-résistantes posent de véritables échecs thérapeutiques. Leur large dissémination au niveau des hôpitaux semble être le reflet d'une utilisation inconsciente d'antibiotiques et l'absence d'une politique nationale de lutte contre les BMR et les infections urinaires nosocomiales.

La prévention de ces infections passe obligatoirement par le respect de certaines mesures :

- ✓ Développer la prise de conscience et la sensibilisation de la population des risques et des dangers de l'infection urinaire nosocomiale au sein du personnel soignant ;
- ✓ Développer les systèmes de surveillance clinique, bactériologique et épidémiologique qui favorisent la prise de conscience de l'équipe ;
- ✓ Isoler tout patient porteur d'une infection à germes multirésistants des autres patients du secteur urologique ;
- ✓ Réduire les temps d'hospitalisation pour tout opéré ;
- ✓ Obtenir en salle d'hospitalisation que l'équipe réalise les gestes quotidiens de façon aseptique : usage de gants jetables, lavage des mains fréquent et obligatoire entre chaque patient ; ce lavage est particulièrement difficile à obtenir des médecins. Il se fait plutôt avec des savons antimicrobiens plus efficaces que le savon ordinaire, action complétée par l'application de solution hydroalcoolique ;

- ✓ Eviter le transfert de germes d'une chambre à l'autre (mobilier, matériel, chariots) et isolement des patients infectés ;
- ✓ respecter les consignes concernant les sondes vésicales ; ne mettre une sonde vésicale qu'en cas de stricte nécessité, la retirer le plus rapidement possible, n'utiliser que des systèmes de drainage clos avec valve antiretour et vidange déclive, limiter les manipulations entre sacs collecteurs et sonde et les pratiquer de façon aseptique, poser la sonde de façon aseptique (set de sonde) et respecter les règles fondamentales d'entretien d'une sonde urinaire et d'un système clos ;
- ✓ respecter au bloc opératoire les consignes concernant tenue, masque et couvre-chaussure, les circuits sales (habillage, déchets opératoires...) ;
- ✓ respecter les recommandations concernant l'antibioprophylaxie en urologie.

Perspectives

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

- Abdelaziz, Mohammed O., Celestino Bonura, Aurora Aleo, Teresa Fasciana, Cinzia Calà, et Caterina Mammina. 2013. « Cephalosporin resistant *Escherichia coli* from cancer patients in Cairo, Egypt ». *Microbiology and immunology* 57 (5): 391–395.
- Abderrahim, Amel, Nassima Djahmi, Charlotte Pujol, Sabina Nedjai, Mohamed Cherif Bentakouk, Djamila Kirane-Gacemi, Mazouz Dekhil, Albert Sotto, Jean-Philippe Lavigne, et Alix Pantel. 2017. « First Case of NDM-1-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in Annaba University Hospital, Algeria ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 23 (7): 895-900. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0213>.
- ACHKOUR, Zineb. 2012. « Emergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. » PhD Thesis.
- Agabou, A., A. Pantel, Z. Ouchenane, N. Lezzar, S. Khemissi, D. Satta, A. Sotto, et J.-P. Lavigne. 2014. « First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria ». *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 33 (9): 1641–1646.
- Aggoune, Nadjet, Hassiba Tali-Maamar, Farida Assaous, Nabila Benamrouche, Malek Naim, et Kheira Rahal. 2014. « Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria ». *Journal of global antimicrobial resistance* 2 (4): 327–329.
- Ait El Kadi, M., M. Aghrouch, M. Seffar, A. Bouklouze, Y. Cherrah, K. Souly, et M. Zouhdi. 2006. « Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to imipenem by production of metallo-beta-lactamase ». *Médecine et maladies infectieuses* 36 (7): 386–389.
- Aktaş, Zerrin, Çiğdem Bal Kayacan, Ines Schneider, Barış Can, Kenan Midilli, et Adolf Bauernfeind. 2008. « Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey ». *Chemotherapy* 54 (2): 101–106.
- Al Bayssari, Charbel, Seydina M. Diene, Lotfi Loucif, Sushim Kumar Gupta, Fouad Dabboussi, Hassan Mallat, Monzer Hamze, et Jean-Marc Rolain. 2014. « Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of oprD Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (8): 4966-70. <https://doi.org/10.1128/AAC.02523-13>.

- Altschul, S. 1997. « Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs ». *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Amine, I. Lahlou, H. Salord, Y. Gille, C. Roure, S. Tigaud, T. Bajou, N. Ratbi, et H. L'KASSMI. 2008. « Pseudomonas aeruginosa et résistance isolée à l'imipénème: clone émergent en milieu hospitalier? » *Les technologies de laboratoire* 3 (11).
- Amiri, Atena, Farzaneh Firoozeh, Rezvan Moniri, et Mohammad Zibaei. 2016. « Prevalence of CTX-M-Type and PER Extended-Spectrum β -Lactamases Among Klebsiella spp. Isolated From Clinical Specimens in the Teaching Hospital of Kashan, Iran ». *Iranian Red Crescent Medical Journal* 18 (3): e22260. <https://doi.org/10.5812/ircmj.22260>.
- Andrade, Leonardo Neves, Ângela Novais, Lenita Maria Marcato Stegani, Joseane Cristina Ferreira, Carla Rodrigues, Ana Lucia Costa Darini, et Luisa Peixe. 2018. « Virulence Genes, Capsular and Plasmid Types of Multidrug-Resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-Producing Klebsiella Pneumoniae Isolates from Four Major Hospitals in Brazil ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 91 (2): 164-68. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007>.
- Annie, M., J. Vessières, et M. R. Scavizzi. 1996. « Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques ». *Maladies Infectieuses* 8: 6-10.
- AZMOUN, Safaâ. 2016. « Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au CHU de Marrakech », mai, 39-40.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Zaket, Dominique Decré, Nathalie Genel, Zahia Boucherit-Otmani, Guillaume Arlet, et Mourad Drissi. 2013. « Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria)(2008-2010) ». *Microbial Drug Resistance* 19 (3): 185-190.
- BAKHOUM, IMNS. 2004. « Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne ». *Université Cheikh Anta diop de Dakar. Faculté de médecine, de pharmacie. Et d'odontostomatologie*.
- Bakour, S., V. Garcia, L. Loucif, J.-M. Brunel, A. Gharout-Sait, A. Touati, et J.-M. Rolain. 2015. « Rapid Identification of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, Pseudomonas Aeruginosa and Acinetobacter Baumannii Using a Modified Carba NP Test ». *New Microbes and New Infections* 7 (septembre): 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.07.001>.

- Bakour, S., F. Sahli, A. Touati, et J.-M. Rolain. 2015. « Emergence of KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae* ST512 Isolated from Cerebrospinal Fluid of a Child in Algeria ». *New Microbes and New Infections* 3 (janvier): 34-36. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.09.001>.
- Bakour, Sofiane, Marie Kempf, Abdelaziz Touati, Abdennour Ait Ameer, Djamila Haouchine, Farida Sahli, et Jean-Marc Rolain. 2012. « Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria ». *Journal of medical microbiology* 61 (9): 1341–1343.
- Bakour, Sofiane, Abdelaziz Touati, Taous Bachiri, Farida Sahli, Djamel Tiouit, Malek Naim, Mounia Azouaou, et Jean-Marc Rolain. 2014. « First Report of 16S rRNA Methylase ArmA-Producing *Acinetobacter Baumannii* and Rapid Spread of Metallo- β -Lactamase NDM-1 in Algerian Hospitals ». *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy* 20 (11): 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.07.010>.
- Bakour, Sofiane, Abdelaziz Touati, Farida Sahli, Abdennour Ait Ameer, Djamila Haouchine, et Jean-Marc Rolain. 2013. « Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria ». *Diagnostic microbiology and infectious disease* 76 (4): 529–531.
- Barguigua, Abouddihaj, Fatima El Otmani, Mustapha Talmi, Fatna Bourjilat, Fatima Haouzane, Khalid Zerouali, et MohammedYR 2011 Timinouni. 2011. « Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco ». *Journal of Medical Microbiology* 60 (9): 1344-52. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.032482-0>.
- Barguigua, Abouddihaj, Fatima El Otmani, Mustapha Talmi, Khalid Zerouali, et Mohammed Timinouni. 2013. « Prevalence and types of extended spectrum β -lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community ». *Microbial pathogenesis* 61: 16–22.
- Baroud, áM, I. Dandache, G. F. Araj, R. Wakim, S. Kanj, Z. Kanafani, M. Khairallah, A. Sabra, M. Shehab, et G. Dbaibo. 2013. « Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases ». *International journal of antimicrobial agents* 41 (1): 75–79.

- Batah, Rima, Lotfi Loucif, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Nafissa Boutefnouchet, Hamoudi Allag, et Jean-Marc Rolain. 2015. « Outbreak of *Serratia marcescens* coproducing ArmA and CTX-M-15 mediated high levels of resistance to aminoglycoside and extended-spectrum beta-lactamases, Algeria ». *Microbial Drug Resistance* 21 (4): 470–476.
- Belbel, Zineb, Houria Chettibi, Mazouz Dekhil, Ali Ladjama, Sabrina Nedjai, et Jean-Marc Rolain. 2014. « Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital ». *Microbial Drug Resistance* 20 (4): 310–315.
- Belmonte, O., D. Drouet, J. Alba, M. P. Moiton, B. Kuli, N. Lugagne-Delpon, C. Mourlan, et M. C. Jaffar-Bandjee. 2009. « Evolution of Enterobacteriaceae resistance to antibiotics in Reunion Island: emergence of extended-spectrum beta-lactamases ». *Pathologie-biologie* 58 (1): 18–24.
- Ben Redjeb, et Boutiba-Ben Boubaker I. 2009. « L'antibio-résistance en Tunisie –LART- ». 2009. <https://www.google.fr/search?q=Ben+Redjeb+S,+Boutiba-Ben+Boubaker+I.+L%27antibior%C3%A9sistance+en+Tunisie+Ben+Redjeb+S,+Boutiba-Ben+Boubaker+I.+L%E2%80%99antibior%C3%A9sistance+en+Tunisie&spell=1&sa=X&ved=2ahUKEwjotKGwitL2AhUITcAKHeheDScQBSgAegQIARA7&biw=1138&bih=536&dpr=1.2>.
- Bennett, Jason W., Janelle L. Robertson, Duane R. Hospenthal, Steven E. Wolf, Kevin K. Chung, Katrin Mende, et Clinton K. Murray. 2010. « Impact of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella Pneumoniae* Infections in Severely Burned Patients ». *Journal of the American College of Surgeons* 211 (3): 391-99. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2010.03.030>.
- Bennett, John V., William Robert Jarvis, et Philip S. Brachman. 2007. *Bennett & Brachman's Hospital Infections*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Benouda, A., O. Touzani, M.-T. Khairallah, G. F. Araj, et G. M. Matar. 2010. « First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 104 (4): 327–330.
- Bergogne-Bérézin, Eugénie. 2007. « The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens ». *Current infectious disease reports* 3 (5): 440–444.
- Berrazeg, Meryem, Seydina M. Diene, Mourad Drissi, Marie Kempf, Hervé Richet, Luce Landraud, et Jean-Marc Rolain. 2013. « Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS ». *PLoS One* 8 (4): e61428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061428>.

- BIOMERIEUX, SA. 2004. « Api 20 NE Réf. 20 050 ». *Système d'identification des bacilles à Gram négatif*, 1–4.
- Birgy, André, Catherine Doit, Patricia Mariani-Kurkdjian, Nathalie Genel, Albert Faye, Guillaume Arlet, et Edouard Bingen. 2011. « Early detection of colonization by VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and NDM-1-producing *Escherichia coli* in two children returning to France ». *Journal of clinical microbiology* 49 (8): 3085–3087.
- Boubaker, I. Boutiba-Ben, R. Ghozzi, H. Ben Abdallah, K. Mamlouk, A. Kamoun, et S. Ben Redjeb. 2004. « Evolution of Acquired Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Enterobacteriaceae in a Tunisian Hospital 1993–2001 ». *Clinical Microbiology and Infection* 10 (7): 665–67. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00959.x>.
- Bouguenoun, Widad, Sofiane Bakour, Ahmed Aimen Bentorki, Charbel Al Bayssari, Tarek Merad, et Jean-Marc Rolain. 2016. « Molecular Epidemiology of Environmental and Clinical Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli from Hospitals in Guelma, Algeria: Multiple Genetic Lineages and First Report of OXA-48 in *Enterobacter Cloacae* ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 7: 135–40. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.08.011>.
- Boulangier, Anne, Thierry Naas, Nicolas Fortineau, Samy Figueiredo, et Patrice Nordmann. 2012. « NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56 (4): 2214–2215.
- Bradford, Patricia A. 2001. « Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat ». *Clinical microbiology reviews* 14 (4): 933–951.
- Brahmia, Safa, Rym Lalaoui, Sabrina Nedjai, Nassima Djahmi, Samir Chettibi, Jean-Marc Rolain, et Sofiane Bakour. 2021. « First Clinical Cases of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Algeria and Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST101 Harboring bla OXA-48 Gene in the Urology Department of Annaba Hospital ». *Microbial Drug Resistance* 27 (5): 652–659.
- Bratu, Simona, David Landman, Robin Haag, Rose Recco, Antonella Eramo, Maqsood Alam, et John Quale. 2005. « Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium ». *Archives of internal medicine* 165 (12): 1430–1435.
- Brink, Adrian J., Jennifer Coetzee, Cornelis G. Clay, Sindi Sithole, Guy A. Richards, Laurent Poirel, et Patrice Nordmann. 2012. « Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase

- (NDM-1) and Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase (KPC-2) in South Africa ». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (2): 525-27. <https://doi.org/10.1128/JCM.05956-11>.
- Buxeraud, Jacques, et Sébastien Faure. 2016. « Les bêtalactamines ». *Actualités Pharmaceutiques* 55 (558): 1-5.
- Cabana, Michael D., Cynthia S. Rand, Neil R. Powe, Albert W. Wu, Modena H. Wilson, Paul-André C. Abboud, et Haya R. Rubin. 1999. « Why don't physicians follow clinical practice guidelines?: A framework for improvement ». *Jama* 282 (15): 1458-1465.
- Cai, Jia Chang, Hong Wei Zhou, Rong Zhang, et Gong-Xiang Chen. 2008. « Emergence of Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, and Escherichia coli isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52 (6): 2014-2018.
- Cantón, Rafael, A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, et Teresa M. Coque. 2008. « Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe ». *Clinical Microbiology and infection* 14: 144-153.
- Caron, F. 2003. « Physiopathologie des infections urinaires nosocomiales ». *Médecine et maladies infectieuses* 33 (9): 438-446.
- Carpentier, J. P., M. Morillon, R. Petrognani, et J. D. Cavallo. 2003. « Infections à bacille pyocyanique ». *Maladies infectieuses (traité)*. ISSN, 1166-8598.
- Carrèr, Amélie, Laurent Poirel, Mesut Yilmaz, Ozay Arikian Akan, Cilli Feriha, Gaëlle Cuzon, Ghassan Matar, Patrick Honderlick, et Patrice Nordmann. 2010. « Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (3): 1369-1373.
- Castanheira, Mariana, Lalitagauri M. Deshpande, Dilip Mathai, Jan M. Bell, Ronald N. Jones, et Rodrigo E. Mendes. 2011. « Early dissemination of NDM-1-and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007 ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (3): 1274-1278.
- Cattoir, Vincent. 2012. « Quinolones: de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance ». *Revue francophone des laboratoires* 2012 (445): 79-87.
- Cattoir, Vincent, et France Bicêtre. 2008. « Les Nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) ». *Pathologie infectieuse en réanimation*, 204-209.

- Cazes, Marie. 2017. « La dispensation des fluoroquinolones par le pharmacien d'officine ». PhD Thesis, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Charfi-Kessiss, Karama, Wejdene Mansour, Anis Ben Haj Khalifa, Maha Mastouri, Patrice Nordmann, Mahjoub Aouni, et Laurent Poirel. 2014. « Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the blaOXA-23 and the blaGES-11 genes in a neonatology center in Tunisia ». *Microbial pathogenesis* 74: 20–24.
- Chen, Liang, Barun Mathema, Kalyan D. Chavda, Frank R. DeLeo, Robert A. Bonomo, et Barry N. Kreiswirth. 2014. « Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding ». *Trends in microbiology* 22 (12): 686–696.
- Chevalier, Jacqueline, Céline Mulfinger, Eric Garnotel, Pierre Nicolas, Anne Davin-Régli, et Jean-Marie Pagès. 2008. « Identification and evolution of drug efflux pump in clinical *Enterobacter aerogenes* strains isolated in 1995 and 2003 ». *PLoS One* 3 (9): e3203.
- Cholley, Pascal. 2010. « Analyse génétique des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'Est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux ». *Université de Franche Comté*.
- Chou, Yen Y., Sheng Kang Chiu, Hung Cheng Lai, et Feng Y. Chang. 2009. « Tubo-ovarian abscess with *Morganella morganii* bacteremia ». *J Microbiol Immunol Infect* 42 (4): 357–359.
- Conly, J., J. Pitout, B. Dalton, et D. Sabuta. 2011. « La NDM-1: summum de la résistance aux antimicrobiens ». *Centre de collaboration nationale des maladies infectieuses* 33 (1).
- Corvec, Stephane, Nathalie Caroff, Eric Espaze, Cecile Giraudeau, Henri Drugeon, et Alain Reynaud. 2003. « AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains ». *Journal of antimicrobial chemotherapy* 52 (4): 629–635.
- Cosgrove, Sara E. 2006. « The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs ». *Clinical Infectious Diseases* 42 (Supplement_2): S82–S89.
- Cuzon, Gaele, Chafia Bentchouala, Anais Vogel, Mélanie Héry, Abdesselam Lezzar, Farida Smati, Laurent Dortet, et Thierry Naas. 2015. « First Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates in Constantine, Algeria ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 46 (6): 725–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.005>.
- Cuzon, Gaele, Remy A. Bonnin, et Patrice Nordmann. 2013. « First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France ». *PLoS One* 8 (4): e61322.

- Descy, Julie, Cécile Meex, Pierrette Melin, Marie-Pierre Hayette, Pascale Huynen, et Patrick De Mol. 2010. « Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute ». *Revue Médicale de Liège* 65 (Suppl. Synthèse 2010). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/83161>.
- Diancourt, Laure, Virginie Passet, Jan Verhoef, Patrick A. D. Grimont, et Sylvain Brisse. 2005. « Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8): 4178-82. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.
- Diene, Seydina M., Nicolas Bruder, Didier Raoult, et Jean-Marc Rolain. 2011. « Real-Time PCR Assay Allows Detection of the New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-1)-Encoding Gene in France ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 37 (6): 544-46. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.006>.
- Diene, Seydina M., Vicky Merhej, Mireille Henry, Adil El Filali, Véronique Roux, Catherine Robert, Saïd Azza, Frederick Gavory, Valérie Barbe, et Bernard La Scola. 2013. « The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new “killer bugs” are created because of a sympatric lifestyle ». *Molecular biology and evolution* 30 (2): 369–383.
- Djahmi, Nassima, Catherine Dunyach-Remy, Alix Pantel, Mazouz Dekhil, Albert Sotto, et Jean-Philippe Lavigne. 2014. « Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter Baumannii* in Mediterranean Countries ». *BioMed Research International* 2014: 305784. <https://doi.org/10.1155/2014/305784>.
- Dortet, L., L. Poirel, et P. Nordmann. 2013. « Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases ». *Feuillets de Biologie* 312: 1–13.
- Dortet, Laurent, Laurent Poirel, et Patrice Nordmann. 2012. « Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56 (12): 6437–6440.
- EL ASSIMI, Ihssane. 2021. « ETUDE RÉTROSPECTIVE DES INFECTIONS URINAIRES AU SEIN DU SERVICE D'UROLOGIE, CHU MOHAMMED VI, MARRAKECH 2018-2019 ». PhD Thesis.
- El Bakkouri, Jalila, Houria Belabbes, Khalid Zerouali, Abdelmajid Belaiche, Driss Messaouidi, G. Claude, J. David, et N. El Mdaghri. 2009. « Résistance aux antibiotiques d'*Escherichia coli* uropathogène communautaire et consommation d'antibiotiques à casablanca (Maroc) ». *European Journal of Scientific Research* 36 (1): 49–55.

- El MAHI, Fadoua. 2013. « Profil épidémiologique des Entérobactéries productrices de carbapénèmases diagnostiquées au laboratoire de microbiologie du CHU de Rabat. » PhD Thesis.
- El-Herte, Rima I., George F. Araj, Ghassan M. Matar, Maysa Baroud, Zeina A. Kanafani, et Souha S. Kanj. 2012. « Detection of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in Lebanon ». *The Journal of Infection in Developing Countries* 6 (05): 457–461.
- Ellatifi, Oussama. 2011. « Place des fluoroquinolones dans le traitement des infections urinaires dans les établissements de santé lorrains ». PhD Thesis, UHP-Université Henri Poincaré.
- Elouennass, M., I. Sahnoun, A. Zrara, T. Bajjou, et S. Elhamzaoui. 2008. « Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005) ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 38 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.10.006>.
- Emmanuel, Evens. 2004. « Evaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers ». PhD Thesis, Insa Lyon.
- Eyquem, André, Joseph Alouf, et Luc Montagnier. 2000. *Traité de microbiologie clinique: deuxièmes mises à jour et compléments*. Piccin.
- Fatoumata, Toure. 2004. « Résistance aux bêta-lactamines de souches bactérienne isolées d'hémoculture au CHU A. LE DANTEC ». PhD Thesis, Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P: 29-40.
- Figueiredo, Samy. 2011. « *Acinetobacter* spp. et réservoir de gènes de carbapénèmases ». PhD Thesis, Paris 11.
- Fleming, P. C., M. Goldner, et D. G. Glass. 1963. « Observations on the Nature, Distribution, and Significance of Cephalosporinae. » *Lancet*, 1399–401.
- François, J., C. Monique, W. Michèle, et G. Alan. 2004. « From antibiogram to prescription ». *France: bioMérieux*.
- Gaibani, P., S. Ambretti, A. Berlingeri, M. Cordovana, P. Farruggia, M. Panico, M. P. Landini, et V. Sambri. 2011. « Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011 ». *Eurosurveillance* 16 (47): 20027.
- Genieys, Yannick. 2018. « Suivi des recommandations de l'ANSM pour l'utilisation de la Nitrofurantoïne dans les infections urinaires-vision locale dans une pharmacie d'officine ». PhD Thesis, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

- Gharout-Sait, Alima, Abdelaziz Touati, Mourad Ahmim, Lucien Brasme, Thomas Guillard, Amir Aghsous, et Christophe de Champs. 2019. « Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in bat guano ». *Microbial Drug Resistance* 25 (7): 1057–1062.
- Gharout-Sait, Alima, Abdelaziz Touati, Said Benallaoua, Thomas Guillard, Lucien Brasme, Jannick Madoux, et Christophe De Champs. 2012. « CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria ». *African Journal of Microbiology Research* 6 (25): 5306–5313.
- Giani, Tommaso, Viola Conte, Vincenzo Di Pilato, Richard Aschbacher, Cordula Weber, Clara Larcher, et Gian Maria Rossolini. 2012. « *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn 1999 transposon derivative ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56 (4): 2211–2213.
- Grabe, M. 2007. « Les facteurs de risque pour les infections urinaires en urologie ». In *Les infections urinaires*, édité par Bernard Lobel et Claude-James Soussy, 61–72. Monographies en urologie. Paris: Springer. https://doi.org/10.1007/978-2-287-48617-3_4.
- Guessennd, N., S. Bremont, V. Gbonon, A. Kacou-NDouba, E. Ekaza, T. Lambert, M. Dosso, et P. Courvalin. 2008. « Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire ». *Pathologie Biologie* 56 (7-8): 439–446.
- Guillard, T., et E. Cambau. 2012. « Une brève histoire des résistances plasmidiques aux quinolones ». *Journal des Anti-infectieux* 15 (1): 1–8.
- Gülmez, Dolunay, Neil Woodford, Marie-France I. Palepou, Shazad Mushtaq, Gokhan Metan, Yusuf Yakupogullari, Sesin Kocagoz, Omrum Uzun, Gulsen Hascelik, et David M. Livermore. 2008. « Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss ». *International journal of antimicrobial agents* 31 (6): 523–526.
- Gupta, Sushim Kumar, Babu Roshan Padmanabhan, Seydina M. Diene, Rafael Lopez-Rojas, Marie Kempf, Luce Landraud, et Jean-Marc Rolain. 2014. « ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool to Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1): 212–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>.

- Gupta, Varsha, Priya Datta, et Jagdish Chander. 2007. « Prevalence of metallo- β lactamase (MBL) producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in a tertiary care hospital in India ». *Journal of Infection* 52 (5): 311–314.
- Hashimoto, Aki, Maki Nagamatsu, Norio Ohmagari, Kayoko Hayakawa, Yasuyuki Kato, et Teruo Kirikae. 2014. « Isolation of OXA-48 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST101 from an Overseas Traveler Returning to Japan ». *Japanese Journal of Infectious Diseases* 67 (2): 120–21.
- Iabadene, Hassen, Yamina Messai, Houria Ammari, Nadjia Ramdani-Bouguessa, Saliha Lounes, Rabah Bakour, et Guillaume Arlet. 2008. « Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria ». *Journal of antimicrobial chemotherapy* 62 (1): 133–136.
- Jacoby, George A., et Luisa Silvia Munoz-Price. 2005. « The new β -lactamases ». *New England Journal of Medicine* 352 (4): 380–391.
- Jana, S., et J. K. Deb. 2006. « Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance ». *Applied microbiology and biotechnology* 70 (2): 140–150.
- Jeong, Seok Hoon, Il Kwon Bae, Kwang Ok Park, Young Jun An, Seung Ghyu Sohn, Seon Ju Jang, Kwang Hoon Sung, et al. 2006. « Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea ». *T200600985.pdf* 44 (4): 423–31.
- Kac, Guillaume, Isabelle Podglajen, Sabine Vaupré, Nathalie Colardelle, Annie Buu-Hoï, et Laurent Gutmann. 2004. « Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated From Environmental and Clinical Specimens in a Cardiac Surgery Intensive Care Unit ». *Infection Control & Hospital Epidemiology* 25 (10): 852–55. <https://doi.org/10.1086/502308>.
- Kassis-Chikhani, Najiby, Dominique Decré, Philippe Ichai, Christian Sengelin, Delphine Geneste, Liliana Mihaila, Elisabeth Dussaix, et Guillaume Arlet. 2010. « Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (7): 1539–1540.
- Kempf, Marie, Jean-Marc Rolain, Saïd Azza, Seydina Diene, Marie-Laure Joly-Guillou, Gregory Dubourg, Philippe Colson, Laurent Papazian, Hervé Richet, et Pierre-Edouard Fournier. 2013. « Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation ». *Apmis* 121 (1): 64–71.

- Kermas, Rachida, Abdelaziz Touati, Lucien Brasme, Elisabeth Le Magrex-Debar, Sadjia Mehrane, François-Xavier Weill, et Christophe De Champs. 2012. « Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* Serotype Brunei and Heidelberg at the Hussein Dey Hospital in Algiers (Algeria) ». *Foodborne pathogens and disease* 9 (9): 803–808.
- Kettner, M., J. Kallova, M. Hletkova, et P. Milošovič. 1995. « Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates ». *Infection* 23 (6): 380–383.
- Khennouchi, Nour Chems el Houda, Lotfi Loucif, Nafissa Boutefnouchet, Hamoudi Allag, et Jean-Marc Rolain. 2015. « MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum- β -lactamase-and ArmA methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates in Algeria ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (10): 6477–6483.
- Kilic, Abdullah, Zerine Aktas, Orhan Bedir, Ramazan Gumral, Yasemin Bulut, Charles Stratton, Yi-Wei Tang, et A. Celal Basustaoglu. 2011. « Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Turkey ». *Annals of Clinical & Laboratory Science* 41 (2): 161–166.
- Kim, Jong Hoon, Chong Rae Cho, Tae Hyun Um, Ji Yoon Rhu, Eu Suk Kim, Jae Won Jeong, et Hye Ran Lee. 2007. « *Morganella morganii* sepsis with massive hemolysis ». *Journal of Korean medical science* 22 (6): 1082–1084.
- Kirkgöz, Esra, et Yasemin Zer. 2014. « Clonal comparison of *Acinetobacter* strains isolated from intensive care patients and the intensive care unit environment ». *Turkish journal of medical sciences* 44 (4): 643–648.
- Kitchel, Brandon, J. Kamile Rasheed, Jean B. Patel, Arjun Srinivasan, Shiri Navon-Venezia, Yehuda Carmeli, Alma Brolund, et Christian G. Giske. 2009. « Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258 ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (8): 3365–3370.
- Kruger, Tersia, Dora Szabo, Karen H. Keddy, Kathleen Deeley, Jane W. Marsh, Andrea M. Hujer, Robert A. Bonomo, et David L. Paterson. 2004. « Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48 (11): 4263–4270.
- Labid, Asma, Djamila Gacemi-Kirane, Mohammed Timinouni, Kamel Amoura, et Jean-Marc Rolain. 2014. « High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)

- producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria ». *African Journal of Microbiology Research* 8 (9): 947–954.
- Lagha, N., D. A. Abdelouahid, et H. Hassaine. 2015. « Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat ». *Tlemcen: Université Abou Bekr Belkaïd*.
- Lahlou Amine, I., M. Chegri, et H. L'Kassmi. 2009. « Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires à l'hôpital militaire Moulay-Ismaïl de Meknès ». *Antibiotiques* 11 (2): 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2008.10.004>.
- Lahsoune, M., H. Boutayeb, K. Zerouali, H. Belabbes, et N. El Mdaghri. 2007. « Prevalence and in vitro antimicrobial susceptibility patterns of Acinetobacter baumannii strains in a Moroccan university hospital [Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'Acinetobacter baumannii dans un CHU marocain] ».
- Lalaoui, Rym, Sofiane Bakour, Kashat Livnat, Marc Victor Assous, Seydina M. Diene, et Jean-Marc Rolain. 2019. « Spread of Carbapenem and Colistin-Resistant Klebsiella Pneumoniae ST512 Clinical Isolates in Israel: A Cause for Vigilance ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 25 (1): 63-71. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0014>.
- Laurent, Poirel. 2006. « Nouveaux mécanismes de résistance chez Pseudomonas aeruginosa: quelles perspectives ». *XVIIe Congrès nationale de la SFHH-Nantes. P 25*.
- Leavitt, Azita, Shiri Navon-Venezia, Inna Chmelnitsky, Mitchell J. Schwaber, et Yehuda Carmeli. 2007. « Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains in an Israeli hospital ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51 (8): 3026–3029.
- Lee, Chang-Ro, Jung Hun Lee, Kwang Seung Park, Young Bae Kim, Byeong Chul Jeong, et Sang Hee Lee. 2016. « Global dissemination of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods ». *Frontiers in microbiology* 7: 895.
- Lee, Jeom Kyu, Yeong Seon Lee, Yong Keun Park, et Bong Su Kim. 2005. « Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa ». *International journal of antimicrobial agents* 25 (4): 290–295.

- Lee, Kyungwon, Chang Ki Kim, Dongeun Yong, Seok Hoon Jeong, Jong Hwa Yum, Young Hee Seo, Jean-Denis Docquier, et Yunsop Chong. 2010. « Improved Performance of the Modified Hodge Test with MacConkey Agar for Screening Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli ». *Journal of Microbiological Methods* 83 (2): 149-52. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.010>.
- Legrand, Olivier. 2017. « Implication du pharmacien hospitalier dans la prise en charge des infections à bactéries multirésistantes: revue de pertinence des prescriptions de piperacilline/tazobactam et épargne des antibiotiques à large spectre au Centre Hospitalier d'Aubagne ». PhD Thesis.
- Leotard, S., et N. Negrin. 2009. « Epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase in Grasse Hospital (2005-2008) ». *Pathologie-biologie* 58 (1): 35-38.
- Lesage, D., F. Tessier, B. Prieur, et G. Daguet. 1974. « Sensibilité à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole de 2114 souches hospitalières ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 4 (7): 389-396.
- Li, Moli, Pinhua Pan, et Chengping Hu. 2013. « Pathogen distribution and antibiotic resistance for hospital acquired pneumonia in respiratory medicine intensive care unit ». *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical Sciences* 38 (3): 251-257.
- Livermore, David M., Rafael Canton, Marek Gniadkowski, Patrice Nordmann, Gian Maria Rossolini, Guillaume Arlet, Juan Ayala, Teresa M. Coque, Izabela Kern-Zdanowicz, et Francesco Luzzaro. 2007. « CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (2): 165-174.
- Lobel, B. 2003. « Infections urinaires nosocomiales (IN) en chirurgie (dont urologie): qui traiter, quand traiter et comment traiter? » *Médecine et maladies infectieuses* 33 (9): 483-487.
- Loli, A., L. S. Tzouvelekis, E. Tzelepi, A. Carattoli, A. C. Vatopoulos, P. T. Tassios, et V. Miriagou. 2006. « Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying bla VIM-1 ». *Journal of antimicrobial chemotherapy* 58 (3): 669-672.
- Loucif, Lotfi, Ahmed Kassah-Laouar, Mahdia Saidi, Amina Messala, Widad Chelaghma, et Jean-Marc Rolain. 2016. « Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involving a Sequence Type 101 Clone in Batna University Hospital, Algeria ».

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (12): 7494-97.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00525-16>.
- Machuca, Jesús, Lorena López-Cerero, Felipe Fernández-Cuenca, Laura Mora-Navas, Concepción Mediavilla-Gradolph, Inmaculada López-Rodríguez, et Álvaro Pascual. 2019. « OXA-48-like-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Spain in 2014–2015 ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63 (1): e01396–18.
- Magnet, Sophie, et John S. Blanchard. 2005. « Molecular insights into aminoglycoside action and resistance ». *Chemical reviews* 105 (2): 477–498.
- Mainardi, Jean-Luc, Pierre Mugnier, Anne Coutrot, Annie Buu-Hoi, Ekkehard Collatz, et Laurent Gutmann. 1997. « Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Citrobacter freundii* ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41 (11): 2352–2354.
- MALI, Zaïneb. 2019. « Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques En Urologie ». PhD Thesis.
- Mallaret, M. R., A. Le Coziffenecker, D. Luu Duc, A. Brut, M. Veyre, P. Chaize, M. Roussel, A. Bosseray, et M. Micoud. 1998. « Observance du lavage des mains en milieu hospitalier: analyse de la littérature ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 28 (4): 285-90.
[https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(98\)80051-6](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(98)80051-6).
- Masterton, Robert G., et Philip J. Turner. 2006. « Trends in antimicrobial susceptibility in UK centres: the MYSTIC Programme (1997–2002) ». *International journal of antimicrobial agents* 27 (1): 69–72.
- Mathlouthi, Najla, Charbel Al-Bayssari, Allaaeddin El Salabi, Sofiane Bakour, Salha Ben Gwierif, Abdulaziz A. Zorgani, Yahia Jridi, Karim Ben Slama, Jean-Marc Rolain, et Chedly Chouchani. 2016. « Carbapenemases and Extended-Spectrum β -Lactamases Producing Enterobacteriaceae Isolated from Tunisian and Libyan Hospitals ». *Journal of Infection in Developing Countries* 10 (7): 718-27. <https://doi.org/10.3855/jidc.7426>.
- Mathlouthi, Najla, Zaynab Areig, Charbel Al Bayssari, Sofiane Bakour, Allaaeddin Ali El Salabi, Salha Ben Gwierif, Abdulaziz A. Zorgani, Karim Ben Slama, Chedly Chouchani, et Jean-Marc Rolain. 2015. « Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates collected from some Libyan hospitals ». *Microbial Drug Resistance* 21 (3): 335–341.
- Mellouk, Fatma Zohra, Sofiane Bakour, Sameh Meradji, Charbel Al-Bayssari, Mohamed Cherif Bentakouk, Fatiha Zouyed, Abdelghani Djahoudi, Nafissa Boutefnouchet, et Jean Marc Rolain. 2016. « First detection of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa*

- and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria ». *Microbial Drug Resistance* 23 (3): 335–344.
- . 2017. « First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 23 (3): 335-44. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0032>.
- Meradi, L., A. Djahoudi, A. Abdi, M. Bouchakour, Perrier Gros Claude JD, et M. Timinouni. 2009. « Qnr and aac (6³)-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria ». *Pathologie-biologie* 59 (4): e73–8.
- Meradji, Samah, Abouddihaj Barguigua, Khalid Zerouali, Dekhil Mazouz, Houria Chettibi, Naima Elmdaghri, et Mohammed Timinouni. 2015. « Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Eastern Algeria ». *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 4 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0067-2>.
- Mesli, Esma, Meryem Berrazeg, Mourad Drissi, Souad Naïma Bekkhoucha, et Jean-Marc Rolain. 2013. « Prevalence of Carbapenemase-Encoding Genes Including New Delhi Metallo- β -Lactamase in *Acinetobacter* Species, Algeria ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 17 (9): e739-743. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.024>.
- Messai, Y., H. Iabadene, T. Benhassine, S. Alouache, M. Tazir, V. Gautier, G. Arlet, et R. Bakour. 2008. « Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria) ». *Pathologie Biologie* 56 (5): 319–325.
- Mohamudha, Parveen R., B. N. Harish, et S. C. Parija. 2010. « AmpC beta lactamases among Gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India ». *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 596–602.
- Moniri, R., R. Kheltabadi Farahani, Gh Shajari, MH Nazem Shirazi, et A. Ghasemi. 2010. « Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in *acinetobacter* spp. With emergence of multidrug-resistant strains ». *Iranian Journal of Public Health* 39 (2): 63.
- Munoz-Price, L. Silvia, Laurent Poirel, Robert A. Bonomo, Mitchell J. Schwaber, George L. Daikos, Martin Cormican, Giuseppe Cornaglia, et al. 2013. « Clinical Epidemiology of the Global Expansion of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemases ». *The Lancet. Infectious Diseases* 13 (9): 785-96. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).

- Naas, Thierry, Chafia Bentchouala, Gaele Cuzon, Sanàa Yaou, Abdesselam Lezzar, Farida Smati, et Patrice Nordmann. 2011. « Outbreak of Salmonella enterica serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 38 (2): 135–139.
- Naas, Thierry, et Patrice Nordmann. 1994. « Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (16): 7693–7697.
- Naas, Thierry, Patrice Nordmann, Gérard Vedel, et Claire Poyart. 2005. « Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (10): 4423–4424.
- Nabti, Larbi Zakaria, Farida Sahli, Edgarthe Priscilla Ngaiganam, Nadia Radji, Wahiba Mezaghcha, David Lupande-Mwenebitu, Sophie Alexandra Baron, Jean-Marc Rolain, et Seydina M. Diene. 2020. « Development of real-time PCR assay allowed describing the first clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate harboring plasmid-mediated colistin resistance mcr-8 gene in Algeria ». *Journal of global antimicrobial resistance* 20: 266–271.
- Nedjai, Sabrina, A. Barguigua, N. Djahmi, L. Jamali, K. Zerouali, M. Dekhil, et M. Timinouni. 2012. « Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria ». *Médecine et maladies infectieuses* 42 (1): 20–29.
- Nordmann, P., et A. Carrer. 2010. « Les carbapénèmases des entérobactéries ». *Archives de pédiatrie* 17: S154–S162.
- Nordmann, Patrice. 2014. « Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge ». *Medecine et maladies infectieuses* 44 (2): 51–56.
- Nordmann, Patrice, Anne E. Boulanger, et Laurent Poirel. 2012. « NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56 (4): 2184–2186.
- Nordmann, Patrice, Gaele Cuzon, et Thierry Naas. 2009. « The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria ». *The Lancet infectious diseases* 9 (4): 228–236.
- Nordmann, Patrice, Thierry Naas, et Laurent Poirel. 2011. « Global Spread of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (10): 1791–98. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>.

- Nordmann, Patrice, et Laurent Poirel. 2014. « The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (9): 821–830.
- Novais, Â1, C. Sousa, J. de Dios Caballero, A. Fernandez-Olmos, J. Lopes, H. Ramos, T. M. Coque, R. Canton, et L. Peixe. 2014. « MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk Escherichia coli clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393) ». *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 33 (8): 1391–1399.
- Obeidat, Nathir, Fatin Jawdat, Amal G. Al-Bakri, et Asem A. Shehabi. 2014. « Major biologic characteristics of Acinetobacter baumannii isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources ». *American journal of infection control* 42 (4): 401–404.
- Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, et N. Kato. 1994. « Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of Serratia marcescens that shows imipenem resistance ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38 (1): 71–78.
- P. Astagneau E. Seringe. 2010. « Infections nosocomiales et associées aux soins ». EM-Consulte. 2010. <https://www.em-consulte.com/article/237015/infections-nosocomiales-et-associees-aux-soins>.
- Pagès, Jean-Marie. 2004. « Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques ». *médecine/sciences* 20 (3): 346–351.
- Pasteran, Fernando G., Luis Otaegui, Leonor Guerriero, Gabriel Radice, Ricardo Maggiora, Melina Rapoport, Diego Faccone, Ana Di Martino, et Marcelo Galas. 2008. « Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina ». *Emerging infectious diseases* 14 (7): 1178.
- Pechère, Jean-Claude, et Thilo Köhler. 2008. « Patterns and modes of β -lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa ». *Clinical microbiology and infection* 5: S15–S18.
- Petrella, Stephanie, Nathalie Ziental-Gelus, Claudine Mayer, Murielle Renard, Vincent Jarlier, et Wladimir Sougakoff. 2008. « Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A β -lactamase KPC-2 identified in an Escherichia coli strain and an Enterobacter cloacae strain isolated from the same patient in France ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52 (10): 3725–3736.

- Pfeifer, Yvonne, Angela Cullik, et Wolfgang Witte. 2010. « Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens ». *International journal of medical microbiology* 300 (6): 371–379.
- Philippon, A., et G. Arlet. 2005. « Les bêta-lactamases chez les bacilles à Gram-négatif: que de nouveautés en 15 ans! » *Antibiotiques* 7 (4): 247–259.
2006. « β -Lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel! » In *Annales de biologie clinique*, 64:37–51.
- . 2012. « Entérobactéries et bêta-lactamines: phénotypes de résistance naturelle ». *Pathologie Biologie* 60 (2): 112–126.
- Philippon, Alain. 2008. « Résistance bactérienne: définitions, mécanismes, évolution; EMC ». Elsevier Masson SAS, Paris), *Maladies infectieuses* 10: 1–13.
- Piéboji, Joseph Gangoué, Sinata Koulla-Shiro, Pierre Ngassam, Dieudonné Adiogo, Thomas Njine, et Peter Ndumbe. 2004. « Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacilli Isolates from Inpatients and Outpatients at Yaounde Central Hospital, Cameroon ». *International Journal of Infectious Diseases* 8 (3): 147–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.01.001>.
- Pitout, Johann DD, Patrice Nordmann, et Laurent Poirel. 2015. « Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (10): 5873–5884.
- Poirel, L., et P. Nordmann. 2006. « Résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii*: évolution et émergence de nouveaux mécanismes ». *Antibiotiques* 8 (2): 100–107.
- Poirel, Laurent, Mohammed O. Abdelaziz, Sandrine Bernabeu, et Patrice Nordmann. 2012. « Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Egypt. » *International journal of antimicrobial agents* 41 (1): 90–91.
- Poirel, Laurent, Claire Héritier, Venus Tolün, et Patrice Nordmann. 2004. « Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48 (1): 15–22.
- Poirel, Laurent, Johann D. Pitout, et Patrice Nordmann. 2007. « Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences ».
- Porres-Osante, Nerea, Jose Manuel Azcona-Gutiérrez, Beatriz Rojo-Bezares, Esther Undabeitia, Carmen Torres, et Yolanda Sáenz. 2014. « Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (7): 1792–1795.

- Potron, Anaïs, Laurent Poirel, et Patrice Nordmann. 2014. « Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48 ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (1): 467–471.
- Pournaras, Spyros, Efthimia Protonotariou, Evangelia Voulgari, Ioulia Kristo, Evangelia Dimitroulia, Danai Vitti, Maria Tsalidou, Antonios N. Maniatis, Athanassios Tsakris, et Danai Sofianou. 2009. « Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece ». *Journal of antimicrobial chemotherapy* 64 (2): 348–352.
- Qassimi, Loubna. 2010. « Epidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (A propos de 147 cas) ».
- Queenan, Anne Marie, et Karen Bush. 2007. « Carbapenemases: the versatile β -lactamases ». *Clinical microbiology reviews* 20 (3): 440–458.
- Rahal, K. 2010. « Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale en médecine vétérinaire selon les recommandations de l'OMS, 3^{ème} édition ». *Ministère de la Santé & Ministre de l'Agriculture, Algérie*. 67p.
- Ramdani-Bougoussa, Nadjia, Vera Manageiro, Daniela Jones-Dias, Eugenia Ferreira, Mohamed Tazir, et Manuela Caniça. 2011. « Role of SHV β -lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to β -lactams in an Algerian hospital ». *Journal of medical microbiology* 60 (Pt 7): 983.
- Ramdani-Bougoussa, Nadjia, Nuno Mendonça, Joana Leitão, Eugénia Ferreira, Mohamed Tazir, et Manuela Caniça. 2006. « CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria ». *Journal of clinical microbiology* 44 (12): 4584–4586.
- Ramoul, A. 2013. « Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses Thèse de doctorat en microbiologie. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie ». *Roberts SA, Findlay R, Lang SDR. Investigation of an outbreak of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. J Hosp Infect* 40: 228.
- Ramoul, Abir, Lotfi Loucif, Sofiane Bakour, Sabrina Amiri, Mazouz Dekhil, et Jean-Marc Rolain. 2016. « Co-Occurrence of Bla NDM-1 with Bla OXA-23 or Bla OXA-58 in Clinical Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates in Algeria ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 6 (septembre): 136–41. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.05.003>.

- Réjiba, Samia, Paola Sandra Mercuri, Pablo Power, et Amel Kechrid. 2011. « Emergence and dominance of CTX-M-15 extended spectrum beta-lactamase among Escherichia coli isolates from children ». *Microbial drug resistance* 17 (2): 135–140.
- Roberts, James A. 1991. « Etiology and pathophysiology of pyelonephritis ». *American Journal of Kidney Diseases* 17 (1): 1–9.
- Robicsek, Ari, Jacob Strahilevitz, George A. Jacoby, Mark Macielag, Darren Abbanat, Chi Hye Park, Karen Bush, et David C. Hooper. 2006. « Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase ». *Nature medicine* 12 (1): 83–88.
- Robin, Frédéric, Nadjet Aggoune-Khinache, Julien Delmas, Malek Naim, et Richard Bonnet. 2010. « Novel VIM metallo- β -lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (1): 466–470.
- Robin, Frédéric, Lucie Gibold, et Richard Bonnet. 2012. « Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne? » *Revue Francophone des laboratoires* 2012 (445): 47–58.
- Rodriguez-Martinez, Jose-Manuel, Patrice Nordmann, Nicolas Fortineau, et Laurent Poirel. 2010. « VIM-19, a metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (1): 471–476.
- Rolain, J. M., R. Canton, et G. Cornaglia. 2012. « Emergence of Antibiotic Resistance: Need for a New Paradigm ». *Clinical Microbiology and Infection* 18 (7): 615–16. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03902.x>.
- Roschanski, Nicole, Jennie Fischer, Beatriz Guerra, et Uwe Roesler. 2014. « Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae ». *PloS one* 9 (7): e100956.
- Rossolini, G. M., M. M. D'andrea, et C. Mugnaioli. 2008. « The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases ». *Clinical Microbiology and Infection* 14: 33–41.
- Ruppé, E. 2010. « Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi: l'avènement des CTX-M ». *Antibiotiques* 12 (1): 3–16.
- Sachse, Svea, Stephanie Bresan, Marcel Erhard, Birgit Edel, Wolfgang Pfister, Angela Saupe, et Jürgen Rödel. 2014. « Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and

- MALDI-TOF mass spectrometry for typing of β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains ». *Diagnostic microbiology and infectious disease* 80 (4): 267–271.
- Saidel-Odes, Lisa, et Abraham Borer. 2013. « Limiting and Controlling Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* ». *Infection and Drug Resistance* 7 (décembre): 9-14. <https://doi.org/10.2147/IDR.S44358>.
- Sassi, Asma, Lotfi Loucif, Sushim Kumar Gupta, Mazouz Dekhil, Houria Chettibi, et Jean-Marc Rolain. 2013. « NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (9): 5606–5608.
- . 2014. « NDM-5 Carbapenemase-Encoding Gene in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia Coli* from Algeria ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (9): 5606-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.02818-13>.
- Seck, R. 2005. « Resistance des souches d'*Escherichia Coli* et de *Klebsiella Pneumoniae* isolées de d'infections urinaires ».
- SEFRAOUI, Imane. 2015. « Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. » PhD Thesis, Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid.
- Sefraoui, Imane, Meryem Berrazeg, Mourad Drissi, et Jean-Marc Rolain. 2014. « Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated from Western Algeria Between 2009 and 2012 ». *Microbial Drug Resistance* 20 (2): 156-61. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0161>.
- Seng, Piseth, Rolain J.M, Fournier P.E, La Scola B, et Drancourt M. 2010. « MALDI-TOF-Mass spectrometry applications in clinical microbiology ». *Fut. Microbiol*, 2010.
- Siah, S., R. Belefqih, M. Elouennass, F. E. Fouadi, et I. Ihrari. 2009. « [Not Available] ». *Annals of Burns and Fire Disasters* 22 (2): 72-78.
- Sinha, Mahua, H. Srinivasa, et R. Macaden. 2007. « Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species ». *Indian journal of medical research* 126 (1): 63.
- Solé, Mar, Cristina Pitart, Ignasi Roca, Anna Fàbrega, Pilar Salvador, Laura Muñoz, Inés Oliveira, Joaquim Gascón, Francesc Marco, et Jordi Vila. 2011. « First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (9): 4402–4404.

- Sotgiu, G., B. M. Are, L. Pesapane, A. Palmieri, N. Muresu, A. Cossu, M. Dettori, et al. 2018. « Nosocomial Transmission of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* in an Italian University Hospital: A Molecular Epidemiological Study ». *The Journal of Hospital Infection* 99 (4): 413-18. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.033>.
- THABET, Lamia, AMEN ALLAH MESSADI, Balkis MEDDEB, Mondher MBAREK, et Amel TURKI. 2010. « Profil bactériologique des infections urinaires chez la femme à l'Hôpital Aziza Othmana: étude à propos de 495 cas ». *Tunisie médicale* 88 (12): 898–901.
- Thibault, M. 2011. « Les infections nosocomiales: L'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause: Exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce ». *Faculté de Pharmacie, Université Joseph Fourier: Grenoble*.
- Touati, Abdelaziz, Said Benallaoua, Ferhat Djoudi, Janick Madoux, Lucien Brasme, et Christophe De Champs. 2007. « Characterization of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria ». *Microbial Drug Resistance* 13 (2): 85–89.
- Touati, Abdelaziz, Said Benallaoua, Dominique Forte, Janick Madoux, Lucien Brasme, et Christophe De Champs. 2006. « First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algeria ». *International journal of antimicrobial agents* 27 (5): 397–402.
- Touati, Abdelaziz, et Assia Mairi. 2020. « Carbapenemase-producing Enterobacterales in Algeria: a systematic review ». *Microbial Drug Resistance* 26 (5): 475–482.
- Touati, Abdelaziz, Chifiaa Medboua, Djamila Touati, Rachid Denine, Lucien Brasme, et Christophe De Champs. 2012. « CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria) ». *Int. Res. J. Microbiol* 3 (5): 181–185.
- Touati, Meriem. 2013. « Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation-CHU Annaba ».
- Trabelsi, B., Z. Hajjej, B. Meddeb, I. Labben, H. Gharsallah, et M. Ferjani. 2014. « Caractéristiques clinico-épidémiologiques des infections à *Acinetobacter baumannii* en réanimation ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 33 (septembre): A223-24. <https://doi.org/10.1016/j.annfar.2014.07.376>.

- Turmel, Jean-Marie. 2014. « Evaluation des pratiques des médecins généralistes face aux infections urinaires à entérobactéries productrices de bêta lactamases à spectre élargi en 2014 ». PhD Thesis.
- Vallée, M., E. Bey, C. Le Goux, V. Cattoir, et B. J. Gaborit. 2018. « Résistances bactériennes: que doit savoir l'urologue? » *Progrès en Urologie-FMC* 28 (4): F103–F106.
- Van Duijn, Pleun J., Mirjam JD Dautzenberg, et Evelien AN Oostdijk. 2011. « Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs ». *Current opinion in critical care* 17 (6): 658–665.
- Van Looveren, M., et H. Goossens. 2004. « Antimicrobial Resistance of Acinetobacter Spp. in Europe ». *Clinical Microbiology and Infection* 10 (8): 684–704. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00942.x>.
- Vatopoulos, A. 2008. « High rates of metallo-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece—a review of the current evidence ». *Eurosurveillance* 13 (4): 7–8.
- Vaux, Sophie, Anne Carbonne, Jean-Michel Thiolet, Vincent Jarlier, Bruno Coignard, et Collective RAISIN. 2011. « Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2004 to 2011 ». *Eurosurveillance* 16 (22): 19880.
- Vincent, Jean-Louis, Jordi Rello, John Marshall, Eliezer Silva, Antonio Anzueto, Claude D. Martin, Rui Moreno, Jeffrey Lipman, Charles Gomersall, et Yasser Sakr. 2009. « International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units ». *Jama* 302 (21): 2323–2329.
- Vora, Samir, et Raymond Auckenthaler. 2009. « Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique ». *Rev Med Suisse* 5: 1991–4.
- Walsh, Timothy R. 2008. « Clinically significant carbapenemases: an update ». *Current opinion in infectious diseases* 21 (4): 367–371.
- Walsh, Timothy R., Mark A. Toleman, Laurent Poirel, et Patrice Nordmann. 2005. « Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? » *Clinical microbiology reviews* 18 (2): 306–325.
- Walther-Rasmussen, Jan, et Niels Høiby. 2007. « Class A carbapenemases ». *Journal of antimicrobial chemotherapy* 60 (3): 470–482.
- Wary, Bernard, et Jean-François Villard. 2006. « Spécificités de l'évaluation de la douleur chez les personnes âgées ». *Psychologie & NeuroPsychiatrie du vieillissement* 4 (3): 171–178.
- Wax, Richard G., Kim Lewis, Abigail A. Salyers, et Harry Taber. 2007. *Bacterial resistance to antimicrobials*. CRC press.

- Wolf, Bart, Luis C. Rey, Luciano B. Moreira, Dana Milatovic, Andre Fleer, Jan Verhoef, et John J. Roord. 2001. « Carriage of gram-negative bacilli in young Brazilian children with community-acquired pneumonia ». *International journal of infectious diseases* 5 (3): 155–159.
- Yaici, Lydia, Marisa Haenni, Estelle Saras, Wafa Boudehouche, Abdelaziz Touati, et Jean-Yves Madec. 2016. « bla NDM-5-carrying IncX3 plasmid in Escherichia coli ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (9): 2671–2672.
- Yala, D., A. S. Merad, D. Mohamedi, et M. N. Ouar Korich. 2001. « Classification et mode d'action des antibiotiques ». *Médecine du Maghreb* 91 (1): 5–12.
- Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, et F. C. Tenover. 2001. « Novel Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of Klebsiella Pneumoniae ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (4): 1151–61. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.
- Yong, Dongeun, Mark A. Toleman, Christian G. Giske, Hyun S. Cho, Kristina Sundman, Kyungwon Lee, et Timothy R. Walsh. 2009. « Characterization of a new metallo- β -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 ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (12): 5046–5054.
- Yousfi, Hanane, Linda Hadjadj, Iman Dandachi, Rym Lalaoui, Adil Merah, Kamel Amoura, Ahlem Dahi, et al. 2019. « Colistin- and Carbapenem-Resistant Klebsiella Pneumoniae Clinical_Isolates: Algeria ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 25 (2): 258–63. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0147>.
- Yousfi, M., A. Mairi, S. Bakour, A. Touati, L. Hassissen, L. Hadjadj, et J.-M. Rolain. 2015. « First report of NDM-5-producing Escherichia coli ST1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria ». *New microbes and new infections* 8: 17.
- Yousfi, Massilia, Abdelaziz Touati, Assia Mairi, Lucien Brasme, Alima Gharout-Sait, Thomas Guillard, et Christophe De Champs. 2016. « Emergence of carbapenemase-producing Escherichia coli isolated from companion animals in Algeria ». *Microbial drug resistance* 22 (4): 342–346.

- Zenati, K., A. Touati, S. Bakour, F. Sahli, et J. M. Rolain. 2016. « Characterization of NDM-1- and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria ». *Journal of Hospital Infection* 92 (1): 19–26.
- Zogheib, E., et H. Dupont. 2005. « Entérobactéries multirésistantes ». *Conférences d'actualisation*, 153–165.

Autres références

AARN : Réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 2014. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Le 15ème rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2014).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013/2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.0. EUCAST 2014.

Webographie

<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.eucast.org>

<http://www.pubmlst.org>

<http://www.pasteur.fr/mlst>



Annexes

Annexe1 : Tableau de lecture de la galerie API 20E (Bio-Mérieux).

Tests	Substrats	Réactions Enzymatiques	Résultats	
			Négatifs	Positifs
ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine Dihydrolase	Jaune	Rouge/Orangé
LDC	Lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Rouge/Orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pale/Grisâtre	Bleu – vert/Vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d’H2S	Incolore/Grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane Désaminase	TDA/ immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d’indole	JAMES (immédiat) ou IND (2 mn)	
			JAMES incolore Vert pale / Jaune	James rose IND
			IND Jaune	Anneau Rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d’acétone	VP1+VP2 (10 min)	
			Incolore	Rose /Rouge
GEL	Gélatinase de Khon	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
MAN	Mannitol	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
INO	Inositol	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
SOR	Sorbitol	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
RHA	Rhamnose	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
SAC	Saccharose	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
MEL	Melibiose	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
AMY	Amygdaline	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
ARA	Arabinose	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu ver	Jaune
OX		Cytochrome Oxydase	OX (1-2 min)	
			Incolore	Violet
NO3-NO3	Tube de Glu	Production de (NO2) Production de (NO3)	NIT1+NIT2 (2-3 min)	
			Jaune	Rouge
			ZN	
			Rouge	Jaune

Annexe 2: Tableau de Lecture de la galerie API 20 NE (Bio-Mérieux)

Tests	Substrats	Réactions Enzymatiques	Résultats	
			Négatifs	Positifs
No3	Potassium nitrate	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1+NIT2 (2 à 5 min)	
			Incolore	Rose-rouge
			ZN (5min)	
			Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	Réduction des nitrates en nitrites	JAMES (immédiat)	
			Incolore/vert-pale/ jaune	Rose
GLU	D-glucose	Fermentation du glucose	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine du glucose	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse (B-glucosidase) (esculine)	Jaune	Grise/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse protéase gélatine	Pas de diffusion de pigment	Diffusion de pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-B-D-galactopyranoside	B-galactosidase (para-nitophényl-B-D-galactopyranoside)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Assimilation (glucose)	Transparence	Trouble
ARA	D-arabinose	Assimilation (arabinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	Assimilation (mannose)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	Assimilation (mannitol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétylglucosamine	Assimilation (N-acétylglucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation (maltose)	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	Assimilation (potassium gluconate)	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	Assimilation (acide caprique)	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	Assimilation (acide adipique)	Transparence	Trouble
MLT	acide malate	Assimilation (acide malate)	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	Assimilation (trisodium citrate)	Transparence	Trouble
PAC	Acide Phénylacétique	Assimilation (Acide Phénylacétique)	Transparence	Trouble

Annexe 3 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des 14 souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénème isolées du service d'urologie CHU-Annaba, Algérie.

<i>Isolates</i>	<i>Date of isolation</i>	<i>Sex</i>	<i>Age</i>	<i>Ward</i>	<i>Simple origine</i>	<i>MIC ERT (mg/L)</i>	<i>MIC IMP (mg/L)</i>	<i>MCNPT</i>	<i>Antibiotic resistance profile</i>	<i>Antibiotic resistance genes</i>	<i>MLST</i>
KP-348	January 13, 2015	M	67	Urology	Urine	>32	2	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, CIP, FOF, NIT, DOX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-1011	January 27, 2015	M	58	Urology	Pus	>32	2	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, AMK, CIP, FOF, NIT, DOX	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-1001	March 5, 2015	F	31	Urology	Pus	>32	1.5	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, AMK, CIP, NIT	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-14	March 19, 2015	F	52	Urology	Urine	>32	1	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, CIP, FOF, NIT, DOX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-4750	June 7, 2015	M	25	Urology	Urine	>32	3	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, FOF, NIT, DOX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-A6	June 19, 2015	M	73	Urology	Urine	>32	3	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, NIT, DOX	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-A4	June 19, 2015	M	53	Urology	Urine	>32	4	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, FOF, NIT, DOX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-A5	June 28, 2015	M	19	Urology	Nephrostomy	>32	4	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, NIT, DOX	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101

Annexe

<i>Isolates</i>	<i>Date of isolation</i>	<i>Sex</i>	<i>Age</i>	<i>Ward</i>	<i>Simple origine</i>	<i>MIC ERT (mg/L)</i>	<i>MIC IMP (mg/L)</i>	<i>MCNPT</i>	<i>Antibiotic resistance profile</i>	<i>Antibiotic resistance genes</i>	<i>MLST</i>
KP-A1	August 1, 2015	F	32	Urology	Urine	>32	3	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, FOF, NIT, DOX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-A06	January 12, 2016	M	48	Urology	Urine	>32	4	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, FOF, SXT	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-15	March 29, 2016	F	76	Urology	Urine	4	8	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, NIT	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	258
KP-18	February 3, 2017	F	69	Urology	Pus	3	8	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, CIP, NIT	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	258
KP-1045	August 2, 2017	F	51	Urology	Pus	>32	3	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, FOF, NIT, DOX	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	101
KP-10	September 14, 2017	F	47	Urology	Urine	3	8	+	AMX, AMC, TZP, CEF, CRO, FEP, ETP, IPM, AMK, GEN, CIP, NIT	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	258

Annexe 4 : solution SOC utilisée dans la transformation

S.O.C. Le milieu est utilisé dans l'étape finale de la transformation des cellules bactériennes pour obtenir une efficacité de transformation maximale d'E. coli. S.O.C. Le milieu est fourni sous forme de flacons de 10 x 10 ml de milieu liquide avec la composition suivante :

- **2 % de tryptone,**
- **0,5 % d'extrait de levure,**
- **10 mM de NaCl,**
- **2,5 mM de KCl,**
- **10 mM de MgCl₂,**
- **10 mM de MgSO₄**
- **20 mM de glucose.**

Annexe 05 : Article publié

First Clinical Cases of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Algeria and Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST101 Harboring blaOXA-48 Gene in the Urology Department of Annaba Hospital

afa Brahmia, Rym Lalaoui, Sabrina Nedjai, Nassima Djahmi, Samir Chettibi, Jean-Marc Rolain, and Sofiane Bakour. *Microbial Drug Resistance*. May 2021. 652-659.

<http://doi.org/10.1089/mdr.2020.0080>

- En ligne avant impression : **01 september 2020**
- Publication **Volume: 27 Issue 5: May 12, 2021**
- Nom du journal : **Microbial Drug Resistance**
- Pays du journal : **Etats-Unis**

Impact Factor: *3.431 

***2020 Journal Citation Reports (Clarivate, 2021), Copyright 2021, Mary Ann Liebert, Inc., publishers**

Editor-in-Chief: Ivo G. Boneca, PhD ISSN: 1076-6294 Online ISSN: 1931-8448