

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et de Microbiologie

Thèse

Pour l'obtention du
Grade de Docteur en Sciences

Fréquence et marqueurs épidémiologiques de
Klebsiella pneumoniae dans les services à haut risque
infectieux au niveau du CHU Benbadis de
Constantine.

Soutenue par SEKHRI-ARAF A Nedjouda

Devant le Jury:

Président : BOUSSEBOUA H, Professeur, Université Mentouri de Constantine

Rapporteur : SMATI F. Professeur, Université Mentouri de Constantine

Membres examinateurs:

BAKOUR R, Professeur Université H. Boumédiène d'Alger

KAREM N., Professeur, Université ES SENIA d'Oran

TOUATI A, Maître de conférences, Université de Béjaïa

Année universitaire: 2010-2011

Dédicaces

Je dédie cette thèse à la mémoire de ma mère, qui nous a quittés très tôt, merci pour tous tes sacrifices. Que dieu le tout puissant t'acceuille dans son vaste paradis.

A mon père qui m'a toujours aidé et soutenu, vous m'avez transmis l'amour de la science et le savoir.

A mon époux pour tous ses encouragements et son soutien, avec tout mon amour, merci pour tout.

A mes enfants chéris: Seif Maamoune, Mohamed Moatez et mon petit poussin Borhane eddine, avec tout mon amour et ma tendresse, j'espère que vous ferez mieux que maman.

A toute ma famille: frères et sœurs, beaux frères et belles sœurs.

A mes deux belles mères Fatima et Warda, avec toute mon affection.

Remerciements

Une thèse est le résultat d'un travail de longue haleine. Ce travail réalisé au laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine, n'aurait pu être réalisé sans un cadre de travail matériel et intellectuel favorable et sans soutien. Que soient donc ici remerciés tous ceux qui m'ont communiqués l'énergie et la confiance nécessaires au déroulement de cette étape scientifique particulière qu'est la thèse.

Mes premiers mots vont à ma directrice de thèse Madame le professeur Smati Farida qui m'a accordé sa confiance, m'a insufflé son enthousiasme, sa curiosité et son engouement scientifique. Merci pour votre aide et votre disponibilité.

A Mr le professeur Monteil Henri, du laboratoire de bactériologie de l'hôpital civil de Starsbourg, pour m'avoir chaleureusement accueillie, pour la réalisation de la biologie moléculaire.

A Mr le professeur Scheftel Jean Michel, du laboratoire de bactériologie de l'hôpital civil de Starsbourg, je lui exprime toute ma gratitude pour le temps qu'il m'a consacré malgré ses obligations et ses responsabilités. En travaillant à ses côtés, j'ai beaucoup appris. Je salue également toutes ses qualités humaines si rares de nos jours.

A Mr le professeur Meunier Olivier, du laboratoire D'hygiène à l'hôpital civil de Starsbourg, merci de m'avoir guidée et appris l'ECP.

A Mr le professeur Bousseboua Hacène, de la faculté des sciences de la nature et de la vie, qui me fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération et mon profond respect.

A Mr le professeur Bakour Rabah, de l'université Houari Boumédiène d'Alger.

J'ai le plaisir de vous présenter ce travail et je m'honore de vous compter parmi les membres du jury.

A Mr le professeur Karem noureddine, de l'université ES Senia d'Oran qui me fait le privilège et l'honneur de juger ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de mes plus vifs remerciements.

A Mr Touati Abdelaziz, maître de conférences à l'université de Bejaïa.

C'est avec un grand plaisir que je vous présente ce travail. Merci d'accepter de l'examiner et merci pour votre enthousiasme et vos encouragements.

A Mr le professeur Benlabeled Kadour, qui m'a guidé et orienté à des moments difficiles dans la réalisation de ce travail, merci pour votre générosité et votre disponibilité.

A madame le professeur Benlatrèche Chrifa rédactrice en chef du Journal Algérien de Médecine (JAM) pour son aimable collaboration.

Je tiens à remercier de tout cœur celles qui m'ont consacré une partie de leur temps, qui ont partagé avec moi leurs savoir faire et leur amitié, je spécifie Mme Danielle Herb du laboratoire de Bactériologie à l'hôpital civil de Strasbourg. Mme Danielle Napolitano du laboratoire d'hygiène à l'hôpital civil de Strasbourg, son cœur plein de générosité, ses talents techniques m'ont beaucoup aidé et contribué à la

réalisation de cette thèse. Tu resteras mon meilleur souvenir de Strasbourg.

Comment ne pas introduire ici celles qui m'ont soutenu moralement et ont ponctué ma vie à des moments forts, à la tête Mme le professeur Sata Dalila, et Mme le professeur Rouabah Leila de la faculté des sciences de la nature et de la vie. Merci pour vos conseils et vos encouragements.

Je remercie également Mr Hamidechi Abdelhafid Maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour la réalisation de l'analyse statistique, qu'il trouve ici ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes remerciements à tous les membres du laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine, à leur tête Mr le docteur Lezzar Abdeslam, Mme le professeur Bouzitouna Chafia, Mr le docteur Laouar Hocine pour leurs précieux conseils et leur disponibilité.

Je remercie également les deux chefs de service paramédical, Mr Louassa Abderezak et Mme Meheni Zhor (Karima) pour leur aide et compréhension.

A toutes mes amies du laboratoire: Batoune, Meriam, Abla, Saloua, Leila, Hanifa et à toute l'équipe.

A toutes mes amies de la faculté des sciences de la nature et de la vie: Latifa Bouzeraib, Linda Kahali, Nassira Riah, Ilhem Semra.

Sommaire

Introduction

Objectifs

Partie théorique : Connaissances actuelles

La bactérie: *Klebsiella pneumoniae*

1. Définition de l'espèce
2. Classification :
 - 2.1. Classification classique
 - 2.2. Classification actuelle
3. Relation de *K.pneumoniae* avec le groupe des K.E.S
4. Différences entre les principales espèces de *Klebsiella*
5. Habitat
6. Pouvoir pathogène
7. Bactériologie de l'espèce
 - 7.1. Caractères généraux : Morphologie – Caractères cultureux.
 - 7.2. Biologie : Caractères biochimiques – Structure antigénique – Typage : Serotypage – biotypie- Lysotypie

Marqueurs épidémiologiques

Classification des marqueurs

1. Les marqueurs phénotypiques
 - 1.1. Le biotype
 - 1.2. L'antibiotype
 - 1.3. Le sérotype
 - 1.4. Le lysotype
 - 1.5. Le bactériocinotype
 - 1.6. L'électrophorèse des protéines immunoblotting
2. Les marqueurs génotypiques
 - 2.1. Etude du polymorphisme enzymatique par méthode électrophorétique ou Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE)
 - 2.2. Analyse du contenu plasmidique
 - 2.3. Techniques d'hybridation
 - 2.3.1. Sonde reconnaissant l'ADN codant pour l'ARN ribosomal. (Ribotypie)
 - 2.3.2. Hybridation avec d'autres sondes
 - 2.4. Electrophorèse en champ pulsé ou Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)
 - 2.5. Typage après amplification par PCR
 - 2.5.1. Amplification partir de séquences connues
 - 2.5.1.1. Amplification spécifique à partir de séquences répétées (REP-PCR)
 - 2.5.1.2. PCR-ribotypage

Principales familles des antibiotiques actifs sur les BGN et leur mode d'action:

1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane ou au niveau de la paroi bactérienne
2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique
 - 2.1. Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome
 - 2.1.1. Aminosides ou aminoglycosides
 - 2.1.2. Tétracyclines
 - 2.2. Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome
 - 2.2.1. Chloramphénicol
3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques
 - 3.1. Sulfamides et triméthoprim.
 - 3.2. Quinolones.
4. Antibiotiques agissant sur les membranes
 - 4.1. Polymyxines
 - 4.2. Nitrofuranes

Résistance aux antibiotiques

1. Généralités
2. Les niveaux de résistance
3. Les phénotypes de résistance
4. Résistance naturelle
5. Résistance acquise
6. Résistance croisée et Co-résistance
7. Mécanismes génétiques de la résistance acquise
 - 7.1. Résistance chromosomique
 - 7.2. Résistance extra-chromosomique
8. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise
 - 8.1. Diminution de la perméabilité et efflux actif
 - 8.1.1. Diminution de la perméabilité
 - 8.1.2. Efflux actif
 - 8.2. Modification de la cible des antibiotiques.
 - 8.2.1. Modification des PLP cible des β -lactamines
 - 8.2.2. Modification de la cible des quinolones
 - 8.2.3. Modifications des cibles des sulfamides et du triméthoprim
 - 8.3. Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques
 - 8.3.1. Les β -lactamases
 - 8.3.1.1. Production de β -lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables
 - 8.3.1.2. Production de céphalosporinases chromosomiques par des bactéries à Gram négatif
 - 8.3.2. Aminosides
 - 8.3.3. Quinolones
 - 8.3.4. Phénicolés
9. Origine des gènes de résistance aux antibiotiques
10. Diffusion de la résistance
11. Prévention de la résistance aux antibiotiques

Partie expérimentale

1. Cadre de l'étude
2. Lieu ou centre de l'étude : présentation de l'hôpital de Constantine et du laboratoire de bactériologie de l'université Louis Pasteur de Strasbourg.
3. Matériel
 - 3.1. Souches de *K.pneumoniae* : Recueil des souches, hospitalières et communautaires.
 - 3.1.1. taille de l'échantillon
 - 3.1.2. Prélèvements pathologiques
4. Méthodes d'étude
 - 4.1. Identification bactérienne (Etude systématique) Galerie Api 20E
 - 4.2. Etude de la sensibilité de la souche aux antibiotiques (Antibiogramme)
 - 4.2.1. Phénotypes de résistance aux β -lactamines
 - 4.2.1.1. Pénicillinases de bas niveau
 - 4.2.1.2. Pénicillinases de haut niveau
 - 4.2.1.3. Phénotype TRI (TEM résistant aux inhibiteurs)
 - 4.2.1.4. β -lactamase à spectre étendu (BLSE)
 - 4.2.2. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi
 - 4.2.2.1. Test de synergie
 - 4.2.2.2. Tests complémentaires
 - Test du double disque (test espagnol)
 - Test du rapprochement des disques
 - Test à la cloxacilline
 - 4.2.3. Détermination du phénotype de résistance des BLSE
 - 4.2.4. Les phénotypes rares
 - 4.2.5. Phénotypes de résistance aux aminosides
 - 4.2.6. Phénotypes de résistance aux quinolones.
 - 4.3. Technique de la biologie moléculaire:
 - 4.3.1. Electrophorèse en champs pulsé.
 - 4.3.2. Caractérisation génétique des BLSE.
 - 4.4. Analyse factorielle discriminante (AFD).

Résultats

1. Souches bactériennes isolées.
 - 1.1. Répartition des souches selon l'origine du prélèvement.
 - 1.2. Distribution des souches parmi les prélèvements cliniques
 - 1.3. Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine parmi les prélèvements effectués en 2004
 - 1.4. Répartition des souches de *K.pneumoniae* en fonction des prélèvements positifs
 - 1.5. Répartition des souches selon l'origine et le service d'hospitalisation
 - 1.6. Distribution selon le sexe.
2. Etude analytique en API 20^E :
 - 2.1. Fréquence des profils numériques en API 20E (par ordre numérique)
 - 2.2. Traduction des profils numériques de *Klebsiella pneumoniae*, en Caractères biochimiques
 - 2.3. Relation profils numériques en API 20E et site d'infection
 - 2.4. Répartition des profils par service d'hospitalisation

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*
 - 3.1. Profil de sensibilité globale de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques.
 - 3.2. Variations chez les malades externes
 - 3.3. Variations interservices du profil de sensibilité de *K. pneumoniae* aux antibiotiques
 - 3.3.1. Variations dans les services de soins intensifs
 - 3.3.2. Variation dans les services de chirurgie.
 - 3.3.3. Variations dans les services de médecine.
 - 3.3.4. Variation dans les services de pédiatrie
 - 3.4. Distribution des résistances par service (Etude comparative)
 - 3.5. Taux de résistance de *K.p* par année.
 - 3.6. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux antibiotiques en fonction du prélèvement.
 - 3.7. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines
 - 3.7.1. Répartition des 105 souches de *K.p* productrices de BLSE en fonction des services
 - 3.7.2. Antibiotypes de *K.pneumoniae* productrice de BLSE, isolée au CHU de Constantine durant la période 2002-2004.
 - 3.7.3. CMI moyennes *K. pneumoniae* selon le phénotype.
 - 3.8. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux aminosides.
 - 3.9. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux quinolones.
4. Résultats de la biologie moléculaire
 - 4.1. Electrophorèse en champ pulsé
 - 4.2. Caractérisation génétique des BLSE.
5. Analyse statistique
6. Résultats du génotype, du biotype et de l'antibiotype

Discussion

1. Fréquence d'isolement de *K.p*
2. Fréquence d'isolement de *K.p* en fonction du sexe
3. Distribution des profils en API 20^E
 - 3.1. API 20^E et site d'infection.
 - 3.2. API 20^E et service d'hospitalisation.
4. Résistance et mécanismes de résistance aux antibiotiques de *K.pneumoniae*.
 - 4.1. Résistance de *K.pneumoniae* aux β -lactamines.
 - 4.2. Mécanismes de résistance aux β -lactamines.
 - 4.2.1. *K.pneumoniae* BLSE+ prévalence et répartition.
 - 4.3. Résistance de *K. pneumoniae* aux aminosides.
 - 4.4. Mécanisme de résistance de *K. pneumoniae* aux aminosides.
 - 4.5. Résistance aux quinolones
 - 4.6. Mécanisme de résistance aux quinolones
 - 4.7. Variation interservices de la résistance
 - 4.8. Variation de la résistance en fonction du prélèvement
5. Electrophorèse en champ pulsé

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Résumés

Liste des abréviations

- ADH:** Arginine déshydrolyse
- ADN:** Acide desoxyribonucléique.
- ADNc:** ADN complémentaire
- API20E:** Analytical profile index 20^E (E= Entérobactéries)
- ARN:** Acide ribonucléique
- BGN:** Bacilles à Gram négatif
- BLSE:** β -lactamase à spectre étendu
- C+G%:** Pourcentage en guanine + cytosine du génome (anciennement coefficient de Chagaff)
- C1G:** Céphalosporine de première génération
- C2G:** Céphalosporine de deuxième génération
- C3G:** Céphalosporine de troisième génération
- CHN:** Céphalosporinase de haut niveau
- CMI:** Concentration minimale inhibitrice
- DO:** Densité optique
- ECP:** Electrophorèse en champ pulsé
- Enzyme de restriction: Enzyme bactérienne qui coupe la chaîne d'ADN en des sites précis. Elle est utilisée pour isoler les gènes
- IMP :** Imipénème
- IRIE:** Infections respiratoires inférieures ou basse étendues
- KDa:** Kilodalton
- LCR:** Liquide céphalorachidien
- LDC:** Lysine décarboxylase
- NNIS :** National Nosocomial Infection Surveillance
- ODC:** Ornithine décarboxylase
- PFGE:** Pulsed Field Electrophoresis Gel
- PHN:** Pénicilline de haut niveau
- RM:** Réaction au rouge de Methyl
- SHV :** Sulfhydryl variable
- SNC:** Système nerveux central
- Spe1 :** Sphaerolytus species (enzyme de restriction ou endonucléase isolée de sphaerolytus species.)
- SXT :** Sulfamides + Triméthoprim
- TEM :** D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

USI: Unités de soins intensifs

VP: Réaction de Voges-Proskauer

Xba1 : Xanthomonas badrii (enzyme de restriction ou endonucléase isolée de Xanthomonas badrii)

Liste des figures

- Figure 1** : Nouvelles BLSE.
- Figure 2** : Historique des β -Lactamases
- Figure 3** : Mobilisation d'un transposon (Tn) d'une bactérie donatrice à gauche à une réceptrice par conjugaison.
- Figure 4** : Détection des BLSE.
- Figure 5** : Répartition des souches par année d'étude
- Figure 6** : Galerie API20 E identifiant *K.pneumoniae*.
- Figure 7** : Test du double disque (test espagnol) pour la détection des BLSE.
- Figure 8** : Image de synergie entre AMC (au centre) et β -lactamines
- Figure 9** : Test à la cloxacilline.
- Figure 10** : Schéma explicatif de la détermination des phénotypes de résistance de BLSE.
- Figure 11** : Les différentes étapes de réalisation des plugs.
- Figure 12** : Répartition des souches selon l'origine du prélèvement.
- Figure 13** : Répartition de *Klebsiella pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques.
- Figure 14** : Répartition des souches par service d'hospitalisation.
- Figure 15** : Distribution globale selon le sexe.
- Fig 16**: Sexe ratio par service.
- Figure 17** : Fréquence des profils en API 20^E des 170 souches de *K.p* par ordre numérique.
- Figure 18**: Relation site d'infection et profils en API 20^E.
- Figure 19** : Répartition des profils numériques chez les externes.
- Figure 20** : Répartition des profils numériques dans le service de réanimation.
- Figure 21**: Répartition des profils numériques dans le service de chirurgie.
- Figure 22**: Répartition des profils numériques dans le service de médecine.
- Figure 23** : répartition des profils numériques en pédiatrie-néonatalogie.
- Figure 24**- Profil de sensibilité globale de *K.pneumoniae* aux antibiotiques.
- Figure 25**: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades externes.
- Figure 26**: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades hospitalisés.

Figure 27 : Profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de réanimation.

Figure 28 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans les services de chirurgie.

Figure 29: Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service médecine.

Figure 30 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de néonatalogie.

Figure 31: Répartition des résistances par service.

Figure 32: Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* par année.

Figure 33: Répartition des résistances de *K.pneumoniae* aux antibiotiques en fonction du prélèvement.

Figure 34 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Figure 35: Résistances associées aux phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Figure 36: Répartition des 105 souches de *K.p* productrices de BLSE en fonction des services.

Figure 37 : Répartition des *K.p* BLSE+ selon le type de prélèvement.

Figure 38 : Répartition (%) des principaux phénotypes de résistance aux aminosides chez *K.pneumoniae*.

Figure 39 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux quinolones, chez *K.pneumoniae*.

Figure 40: Les profils de migration obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *Spe I* de l'ADN bactérien des 52 souches de *K.p* ayant servi à la biologie moléculaire.

Figure 41: Dendrogramme représentatif de l'électrophorèse en champ pulsé.

Figure 42: Résultats de l'analyse factorielle discriminante.

Liste des tableaux

Tableau1: principaux caractères phénotypiques des espèces-types du groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES) et des espèces biochimiquement apparentées.

Tableau 2: Caractères utiles au diagnostic différentiel d'*E.aerogenes* et de *K.pneumoniae*.

Le tableau 3: classification structurale et fonctionnelle des β -lactamases.

Tableau 4 : Principaux mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques actifs sur les BGN.

Tableau 5: Phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Tableau 6: Phénotypes de résistance acquise des entérobactéries aux aminosides et équipement enzymatique correspondant.

Tableau 7: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones.

Tableau 8 : Répartition des souches selon l'origine du prélèvement.

Tableau 9: Répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques.

Tableau 10 : Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine parmi les prélèvements effectués en 2004.

Tableau 11 : Répartition des souches de *K.p* en fonction des prélèvements positifs.

Tableau 12 : Répartition des souches par service d'hospitalisation.

Tableau 13: Sexe ratio par service

Tableau 14 : Fréquence des profils en API 20^E des 170 souches de *K.p* par ordre numérique.

Tableau 15 : Le profil 52 15 773

Tableau 16 : Le profil 52 05 773

Tableau 17 : Le profil 52 05 573

Tableau 18 : Le profil 52 14 773

Tableau 19 : Le profil 52 15 573

Tableau 20: Traduction des profils numériques de *Klebsiella pneumoniae*, en Caractères biochimiques

Tableau 21 : Relation site d'infection et profils en API 20^E

Tableau 22 : Répartition des profils numériques chez les externes.

Tableau 23: Répartition des profils numériques en réanimation.

Tableau 24: Répartition des profils numériques en chirurgie.

Tableau 25: Répartition des profils numériques en médecine.

Tableau 26: Répartition des profils numériques en néonatalogie.

Tableau 27: Profil de sensibilité globale de *K.pneumoniae* aux antibiotiques.

Tableau 28: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades externes.

Tableau 29: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades hospitalisés

Tableau 30 : Profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de réanimation.

Tableau 31 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans les services de chirurgie.

Tableau 32 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans les services de médecine.

Tableau 33 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans les services de néonatalogie.

Tableau 34 : Répartition des résistances par service.

Tableau 35 : Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* par année.

Tableau 36 : Répartition des résistances de *K.pneumoniae* aux antibiotiques en fonction du prélèvement.

Tableau 37: Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Tableau 38: Répartition des 105 souches de *K.p* productrices de BLSE en fonction des services.

Tableau 39: Répartition des *K.p* BLSE+ selon le type de prélèvement.

Tableau 40: Antibiotypes de *K.pneumoniae* productrice de BLSE.

Tableau 41 : CMI moyennes *K. pneumoniae* selon le phénotype. $n= 15$

Tableau 42 : Répartition (%) des principaux phénotypes de résistance aux aminosides chez *K.pneumoniae*.

Tableau 43 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux quinolones, chez *K.pneumoniae*.

Tableau 44 : Légende des phénotypes de résistance aux quinolones.

Tableau 45 : Résultats du génotype (G), du biotype (B) et de l'antibiotype (A).

Tableau 46: Taux de résistance au céfotaxime et à la ceftazidime dans des pays européens et africains

Tableau 47: Taux de sensibilité à la Ciprofloxacine et l'Ofloxacine dans des pays européens et africains.

Introduction

Partie théorique

Introduction

L'infection en milieu hospitalier est connue depuis longtemps et, depuis l'utilisation de l'antibiothérapie elle a progressivement changé de visage et les cliniciens ont été confrontés à des infections à germes autrefois réputés non pathogènes ou saprophytes. Un des exemples le plus frappant pour illustrer ce propos est *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*).

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui fait partie des espèces commensales, c'est-à-dire des flores normales du sujet sain, (Kariuki et *al.*, 2007). Actuellement, elle est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales, d'après le rapport de l'European Antibiotics Resistance Surveillance System (EARSS) de 2008.

L'augmentation à l'échelle mondiale de la résistance médiée par les *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constitue une menace importante pour la santé publique, puisque des souches de *K.pneumoniae* BLSE+ résistantes à toutes les β -lactamines ont été isolées, d'après le Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) de France, en 2001. Au niveau national, et selon le réseau de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (2007-2008), sur 3277 bactéries multi résistantes toutes espèces confondues, isolées en milieu hospitalier et sur un effectif global de 13620 isolats, *K.p* vient en tête avec 31,5% des cas. Le réseau rapporte aussi que 46,2% des souches des *K.p* isolées à l'hôpital sont des BLSE. Les souches résistantes aux β -lactamines sont souvent résistantes aux autres familles d'antibiotiques laissant le champ thérapeutique très réduit.

Ce pathogène opportuniste est isolé d'infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère, principalement chez les malades immunodéprimés, cancéreux, brûlés, cirrhotiques, diabétiques, chez les vieillards, nourrissons, nouveau-nés et prématurés (Melano et al., 2003; Stone, 2003; Sahly et al., 2004)

Cette espèce bactérienne (*K.p*) est distribuée dans tous les services hospitaliers surtout les unités de soins intensifs (USI) (Baerwolf et al., 2002; Gupta et al., 2002; Malek et al., 2003), elle a la particularité d'acquérir des marqueurs de résistance, elle se trouve souvent la première entérobactérie engagée dans un mécanisme de résistance à une nouvelle molécule (Kollef, 2001; Gniadkowski, 2001; Lartigue et al., 2003; Rodriguez et Struelens, 2006).

Le service de microbiologie du CHU Benbadis enregistre en moyenne 400 souches de *K.p* par an, faisant de cette espèce la deuxième entérobactérie isolée par ordre de fréquence après *E.coli*. On remarque qu'un quart des souches de *K.p* en 1995 résiste aux meilleures β -lactamines de l'époque qui sont les céphalosporines de 3ème génération. En 2005, le pourcentage atteint 56% des souches.

La mise en évidence du caractère épidémique de l'infection est importante pour la mise en œuvre rapide des mesures préventives (Armengaud, 2003; Astagneau et Lepoutre, 2002). Dans cette optique notre étude s'est fixée les objectifs suivants :

- Evaluer la fréquence d'isolement et la résistance aux antibiotiques des souches de *K.p* responsables d'infections chez les patients hospitalisés et consultants externes, au CHU de Benbadis en fonction des services et des prélèvements pathologiques.
- Vérifier la clonalité des souches.
- Etudier la dissémination clonale à l'hôpital en réalisant l'antibiotypie, la biotypie et la pulsotypie.

Afin d'obtenir une information épidémiologique plus précise, une analyse factorielle discriminante (AFD), a été réalisée en se basant sur les résultats de l'antibiotypie, ainsi que le test du χ^2 pour la comparaison des taux d'incidence d'une année à l'autre.

1. Classification classique

Règne : Bactéria

Embranchement : Protéobactéria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : Klebsiella

Le genre *Klebsiella* (*Klebsiellas*) comporte cinq espèces dont l'espèce type est

Klebsiella pneumoniae

(Bergey's Manuel, 1994)

2. Classification actuelle

Klebsiella pneumoniae est une bactérie à Gram négatif, membre de la famille des Enterobacteriaceae, découverte il y'a plus de 100 ans.

Les hybridations ADN-ADN ont montré que *K.pneumoniae*, *K.ozaenea* et *K.rhinoscleromatis* forment une unique génomospecies. *K.oxytoca* a longtemps été considéré comme un biovar indologène de *K.pneumoniae* (Richard, 1994). Toutefois, les homologies ADN-ADN séparent nettement *K.oxytoca* et *K.pneumoniae*. Le statut de *K.oxytoca* est controversé, elle pourrait former un nouveau genre (Brisse et Verhoef, 2001).

En janvier 2004, des études d'homologies ADN-ADN et le séquençage des gènes *rpoB*, *phoE*, *gyrA*, *mdh*, *infB* et *nfiH*, permettent d'individualiser, au sein de l'espèce *K.pneumoniae*, un groupe de souches qui sera dénommé *K.variicola*.

Le 10 mai 2004, cette nomenclature sera publiée par inscription sur la liste de validation n°97. *K.variicola* semble avoir des caractères phénotypiques comparables à ceux de *K.pneumoniae* selon Rosenbluet et al (2004); seule la fermentation de l'adonitol (caractère négatif pour la *K.variicola* et positif pour la *K.pneumoniae subsp. Pneumoniae* permet de différencier ces deux taxons (Euzéby, 2004).

3/ Caractères bactériologiques

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6 µm de longueur, se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes et présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae (Ayan M, 2003; Jonas et al., 2004)

Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, aero-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, ODC négative, ADH négative, tryptophane désaminase et phénylalanine désaminase négatives, bêta-glucuronidase négative, n'hydrolysant ni l'ADN ni le Tween 80, ne produisant pas d'hydrogène sulfuré et fermentant de nombreux sucres dont l'inositol. Réaction de Voges-Proskauer positive (VP+) et uréase + (Jarlier et Nordman, 2000; Nauciel, 2000).

- Variétés uréase négative de *K.p*: Certaines souches de *K.p* peuvent paraître <<uréase->> après 24 à 37°C si on utilise des cultures sur gélose nutritive et un milieu réactif à l'urée de type Ferguson (par exemple, milieu urée-indole). Chez plus de la moitié de ces souches l'uréase peut-être mise en évidence en quelques heures, lorsqu'elles ont été cultivées sur des milieux contenant des sucres fermentescibles (milieu de Hajna ou milieu hypersaccharosé de Worfel-Ferguson): la fermentation des glucides, en acidifiant les milieux de culture, favorise la synthèse de l'uréase par la *Klebsiella*. L'autre moitié de ces souches effectivement dépourvue d'uréase acidifie le milieu (urée-indole) dont l'indicateur vire au jaune citrin (Courvalin et Phillippon, 1989). *Klebsiella pneumoniae* cultive sur les milieux classiquement utilisés pour les entérobactéries: gélose nutritive, gélose trypticase soja, gélose au sang, gélose au Mac Conkey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP), gélose éosine bleu de méthylène (EMB), gélose de Drigalski, Hecktoen....

K.p cultive en 24h, excepté la *K.p* du type capsulaire K1 qui cultive plus lentement.

Sur les milieux contenant du lactose et un indicateur de pH, les colonies apparaissent lactose positif (Le Minor et al., 1990; Fauchère et Avril, 2002)

La majorité des souches sont capsulées, mais environ 6% des souches de *K.p* sont dépourvues de capsule. La culture dans les milieux contenant un sucre fermentescible favorise la formation d'une capsule. En revanche, la culture dans un bouillon bilié à 5% favorise l'évolution vers des formes non capsulées.

Au moins 77 antigènes K ont été décrits: les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent au type capsulaire 1 et 2, plus rarement 3 et 4 K (Struve et al., 2003).

La culture ne nécessite pas de facteurs de croissance et elle est obtenue sur des milieux à base de viande. Les colonies sont rondes, plus ou moins bombées, brillantes et visqueuses. Après 24h d'incubation les colonies de *K.pneumoniae subsp.pneumoniae* ont un diamètre de 3 à 4 mm et ont un aspect muqueux.

K.p type capsulaire K1 croît plus lentement et après 48 h d'incubation, les colonies sont volumineuses, bombées, très muqueuses translucides et elles présentent une tendance à la confluence (Riegel, 2003; Fauchère et Avril 2002).

Le diagnostic du genre *Klebsiella* est orienté par l'immobilité constante, la morphologie des colonies et le grand nombre de sucres fermentés.

La détermination des antigènes capsulaires (réaction de Neufeld ou de gonflement de la capsule, immunofluorescence indirecte, coagglutination, précipitation en milieu gélifié....) est une technique discriminante, mais qui nécessite l'absorption des sérums en raison de l'existence de nombreuses communautés antigéniques. Le typage capsulaire peut également confirmer le diagnostic spécifique car les souches de *K.sbsp.Rhinoscleromatis* sont de type capsulaire 3 et la majorité des souches de *K.pneumoniae subsp. Ozaenae* appartiennent au type capsulaire 4 (Euzéby, 2004).

La caractérisation des antigènes O est peu discriminante compte tenu du faible nombre de sérovars (le nombre de sérovars, initialement de 13, est maintenant réduit à 9. De plus, elle est très délicate à réaliser en raison du caractère thermostable des antigènes capsulaires K qui masquent l'agglutination O (Singleton, 2005).

Plusieurs schémas de biotypage ont été proposés. La caractérisation des biovars est simple, mais peu discriminante. Elle peut toutefois être effectuée dans un premier temps avant la détermination des types capsulaires.

Les techniques de lysotypie et de bactériocynotypie sont moins utilisées et réservées à des laboratoires de références.

Les techniques de biologie moléculaire (profil plasmidique, ribotypie, électrophorèse en champ pulsé, AFLP.....) sont actuellement les plus utilisées dans le cadre de l'épidémiologie moléculaire, c'est à dire, la mise en évidence de la circulation de souches, de leur transmission et du réservoir (D'Agata et al.,2001; Dabernat et al., 2004; Prescott et al., 2007).

Les principaux caractères différenciant *K.p* du groupe des KES sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau1: principaux caractères phénotypiques des espèces-types du groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES) et des espèces biochimiquement apparentées (Le Minor et Véron, 1989)

	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>S.marcescens</i>
ONPG,KCN	+	+	+
H ₂ S, désaminase, indole	-	-	-
Mobilité	-	+	+
VP	+	+	+
RM	-	-	-
Uréase	+ (-)	-	-
Citrate de Simmons	+	+	+
LDC	+	-	+
ODC	-	+	+
ADH	-	+	-
Gaz en glucose	+	+	- ou peu de gaz
Rhamnose	+	+	-
Arabinose	+	+	-
Sorbitol	+	+	+
Raffinose	+	+	-
Gélatinase	-	+	+
Lipase,DNase	-	-	+

Si des parentés biochimiques et antigéniques rapprochent *K.p* et *Enterobacter aerogenes*, quelques caractères permettent de les différencier.

Tableau 2: Caractères utiles au diagnostic différentiel d' *E.aerogenes* et de *K.pneumoniae* (Le Minor et al., 1990)

	<i>E.aerogenes</i>	<i>K.pneumoniae</i>
Mobilité	+	-
ODC	+	-
Uréase	-	+ (98%)
Lactose	+	+
m-Hydroxybenzoate	+	-
Gélatinase	+	-
Carbénicilline	S	R
Céfalotine	R	S

Klebsiella variicola se distingue de *K.pneumoniae subsp.pneumoniae* par la fermentation de l'adonitol (caractère négatif pour *K.variicola* et positif pour *K.pneumoniae* (Euzéby, 2004).

Il existe environ 4% de souches atypiques de *K.p* et notamment des souches uréase négative (Le Minor et Véron, 1982)

4/Habitat

K.pneumoniae subsp pneumoniae est une espèce ubiquiste, isolée des eaux de surface, des eaux usées, des effluents industriels, du sol, du bois, de végétaux divers (Dong et al., 2003) et des aliments. Elle est également retrouvée dans la flore fécale d'environ 30% des animaux et de l'homme, elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment respiratoires (Baerwolf et al., 2002).

5/Transmission et pouvoir pathogène

K.p est responsable d'infections spontanées dans 25% des cas, mais surtout d'infections nosocomiales. Dans ce dernier cas, elle est transmise par la manipulation de matériel souillé (cathéter, masque à oxygène...) et par les mains sales.

K.p est pathogène chez l'immunodéprimé, souvent traité par les antibiotiques, chez lequel elle est parfois inoculée lors de manœuvres dans un but diagnostique ou thérapeutique.

K.p est responsable d'infections diverses : infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires, hépatiques intra-abdominales, bactériemies, septicémies, fasciites nécrosantes etc.et elle est responsable d'environ 10% des infections nosocomiales (Chung et al., 1992; Podschum et al., 1998; Dong, 2003). L'arthrite à *K.p* est rare mais elle peut détruire l'articulation provoquant un handicap définitif (Schelenz et al., 2007).

Classiquement, les *Klebsielles* ne sont pas considérées comme agents de toxi-infections alimentaires. Toutefois; lors d'une toxi-infection alimentaire, une souche de *Klebsiella pneumoniae* du type capsulaire 15 et capable de produire une exotoxine de type thermolabile (LT) a été isolée de la viande et des selles des malades (Guiraud, 1998).

6/Facteurs de pathogénicité

Les termes " facteurs de pathogénicité" et " facteurs de virulence" sont employés comme synonymes par certains auteurs, tandis que d'autres accordent une importance particulière pour distinguer les deux termes. Dans notre cas, le terme "pathogénicité" définit la capacité qu'a une bactérie à provoquer la maladie, par contre "virulence" signifie la mesure du degré de pathogénicité de l'espèce bactérienne.

6.1/ Fimbriae

Klebsiella pneumoniae est reconnue comme un important pathogène opportuniste à Gram-. La capacité d'adhésion de la bactérie aux structures de son hôte est essentielle pour le développement de l'infection. Cependant peu d'études ont examiné l'influence des facteurs d'adhésion sur la virulence de K.p (Di-Martino et al., 1999; Podschun et al., 2000).

K.p peut produire des fimbriae de type 1 qui semblent impliqués dans l'attachement aux cellules ciliées de l'appareil respiratoire et aux cellules vésicales (Di Martino et al., 1999). Elle peut également produire des fimbriae de type 3 dont l'importance *in vivo* est mal connue, mais qui pourraient permettre un attachement sur des surfaces inertes comme du matériel médical (Lai et al., 2000; Di-Martino et al., 2003; Riegel 2003). Struve et al (2008), dans une étude au Danemark, montrent que le genre fimbriae type 1 est un facteur significatif dans les infections du tractus urinaire.

6.2/ La capsule :

La capsule a été le premier facteur de virulence décrit. Elle protège les bactéries de la phagocytose et du pouvoir bactéricide du sérum (Lai et al., 2000; Held et al., 2000; Ofek et al., 2001). *In vitro* la présence d'une capsule diminue l'attachement aux cellules intestinales HCT-8 et aux cellules vésicales T-24. Toutefois *in vivo* la capsule n'inhibe pas la colonisation de l'intestin et elle semble être un facteur de virulence important dans les infections urinaires. Divers modèles expérimentaux montrent qu'il existe une relation entre la taille de la capsule et l'intensité du pouvoir pathogène et que les types capsulaires K1, K2, K4, et K5 sont les plus pathogènes (Fung et Chang, 2000; Lai et al., 2000).

6.3/ Le fer :

Il joue un rôle essentiel dans la croissance et la multiplication bactérienne et la majorité des bactéries pathogènes ont développé des systèmes de captation du fer. Les souches de *K.pneumoniae* sont aptes à synthétiser trois sidérophores. Grâce à ces sidérophores, environ 97% des souches de K.p utilisent l'hémoglobine et 56% utilisent l'hémoglobine liée à l'haptoglobine (Fauchère et Avril, 2002).

Entérobactine et aéro bactine :

La grande majorité des souches synthétise de l'entérobactine. Son rôle dans la virulence est mal connu. Dans le sérum, ce sidérophore est inactivé par l'albumine et les IgA. Cependant, l'entérobactine semble être un facteur de virulence important dans les infections urinaires (Euzéby, 2004).

L'aérobactine est produite par environ 16% à 50% des souches. Les gènes codant pour la synthèse de l'aérobactine sont présents sur un plasmide de 180kb. L'introduction de ce plasmide dans une souche qui en est dépourvue permet d'augmenter la virulence d'un facteur 100.

Parmi les souches produisant de l'aérobactine, certaines d'entre elles hébergent l'îlot de pathogénécité HPI (High Pathogenecity Island) des yersinia sp synthétisent de la yersiniobactine (Lai et al., 2000).

6.4/ Les chaînes polysaccharidiques terminales (chaînes O spécifiques) du lipopolysaccharide :

Elles protègent les bactéries de l'activation du système complémentaire et des anticorps spécifiques et ont un rôle protecteur. Comme chez de nombreuses entérobactéries, le lipide A (endotoxine) est doué de propriétés toxiques (Di Martino et al., 2003; Hansen et al., 2003).

6.5/ Uréase: contrairement à ce qui est observé avec d'autres bactéries uréase positive, l'uréase des *Klebsiella sp* n'est pas considérée comme un facteur de virulence.

***Klebsiella pneumoniae* et antibiotiques**

K. pneumoniae est naturellement résistante aux aminopénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une β -lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) du groupe fonctionnel 2a, inhibée par l'acide clavulanique (exemple : *Klebsiella pneumoniae* 1189). Pour la résistance acquise, *K.p* peut présenter une résistance aux inhibiteurs des bêta-lactamases : des β -lactamases de classe A de type mutant TEM résistant aux inhibiteurs (TRI) insensibles à l'acide clavulanique ont été décrites surtout β -lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE). De nombreuses souches de *K. pneumoniae* sont productrices de BLSE. Ainsi en 2005, au CHU Benbadis de Constantine et parmi 407 souches de *K.p* isolées, 222 (54.54%) sont des *K.p* BLSE+ et d'après le réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques, en 2007 la fréquence d'isolement à l'hôpital des souches *K.p* BLSE+ est de 40.2%. Pour la plupart d'entre elles, la production de BLSE se traduit par des images de synergie très caractéristiques entre les céphalosporines de troisième génération et l'acide clavulanique (disque d'augmentin ou de claventin). La diversité des β -lactamases à spectre étendu décrites dans *Klebsiella pneumoniae* est très grande. Des BLSE telles que TEM-3, TEM-10 (ou MGH-1), TEM-12 (ou YOU-2), TEM-24, TEM-26 (ou YOU-1) ont été décrites (Giraud et Fausse, 2003). De nombreux variants de type SHV sont également connus (SHV-4, SHV-5, SHV-6 ou SHV-8) (Rasheed et al., 2000; Chavez et al., 2001; Karbenfeld, 2003; Westreenen et al., 2003). La famille des SHV inclue SHV-2 à SHV-75 qui diffèrent de la SHV-1 par une ou plusieurs positions d'acides aminés (Haegman et al., 2004).

Plus récemment, la BLSE TEM-52 a été caractérisée (Winokur et al., 2001) : elle présente une activité inhabituelle vis-à-vis du moxalactame, ainsi qu'une synergie entre cet antibiotique et le clavulanate.

Il existe un autre type de β -lactamase à spectre étendu, il s'agit des CTX-M ; enzymes hydrolysant le cefotaxime, la ceftriaxone plus efficacement que la ceftazidime (Gniadkowski, 2001; Villegas et al., 2004). C'est une grande famille

phylogénétiquement différente de TEM et SHV, qui comprend plus de 19 enzymes. Les isolats CTX-M ont été trouvés chez beaucoup d'espèces d'entérobactéries et de différentes places géographiques, d'abord au Japon à partir d'épidémies nosocomiales (Yamasaki et al., 2003), ensuite en Europe, en Amérique du sud et plus récemment en Afrique, en Chine et en Corée (Karivski et al 2001; Navarro et Miro, 2002; Melano et al., 2003; Kim et al., 2005; Moubarek et al., 2005; Mamalouk et al., 2006; Touati et al., 2007).

L'enzyme GES ou IBC (Guyana Extended Spectrum) est retrouvée en France la première fois chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée chez un malade guyanais. Depuis, plusieurs enzymes sont reportées: de GES 1 à GES 9. Elles sont responsables d'épidémies dans plusieurs pays (Philippon et Arlet, 2005).

β -lactamases plasmidiques de classe C : chez *Klebsiella pneumoniae*, on connaît un grand nombre de β -lactamases plasmidiques de classe C qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques. On peut citer FOX-1 et MOX-1 (homologues à AmpC de *P. aeruginosa*), et LAT-1 et CMY-2 (homologues à AmpC de *Citrobacter freundii*) (Barlow et al., 2003; Hansen, 2003; Richardo et al., 2005). La résistance au céfépime et au cefpirome a été récemment décrite chez *K. pneumoniae* et semble liée à la combinaison de deux mécanismes : la production à haut niveau d'une BLSE SHV-5 et une diminution de la perméabilité de la membrane externe (Tzouveleakis et Bonomo, 1999; Stürenburg et al., 2004; Haeggman et al., 2004).

La résistance à l'imipénème enfin est décrite aussi: elle peut être due à l'association d'une imperméabilité de la membrane externe (perte d'une porine de 42 Kda) à une production à haut niveau d'une beta-lactamase plasmidique de classe C (ACT- 1, homologue à AmpC de *E. cloacae* et MIR-1) (Nordman et Poirel, 2002; Moland et al., 2003; Jacoby et al., 2004).

On a également décrit au Japon une souche de *K. pneumoniae* résistante à l'imipénème et à la ceftazidime et hébergeant le gène d'une métallo- β -lactamase IMP sur une structure de type intégron (Mena et al., 2006; Kim et al., 2007; Pasteran et al., 2008). Des souches codant pour une imipénémase ont été isolées et des cas groupés d'infections à *K.p* résistante à toutes les bêta-lactamines sont recensées (RAISIN 2001). Des souches portant les gènes codant pour la β -lactamase à spectre étendu

SHV-5 et pour l'imipénémase VIM-1 ont été également décrites (Luzzaro et al., 2004; Farrell et al., 2009)

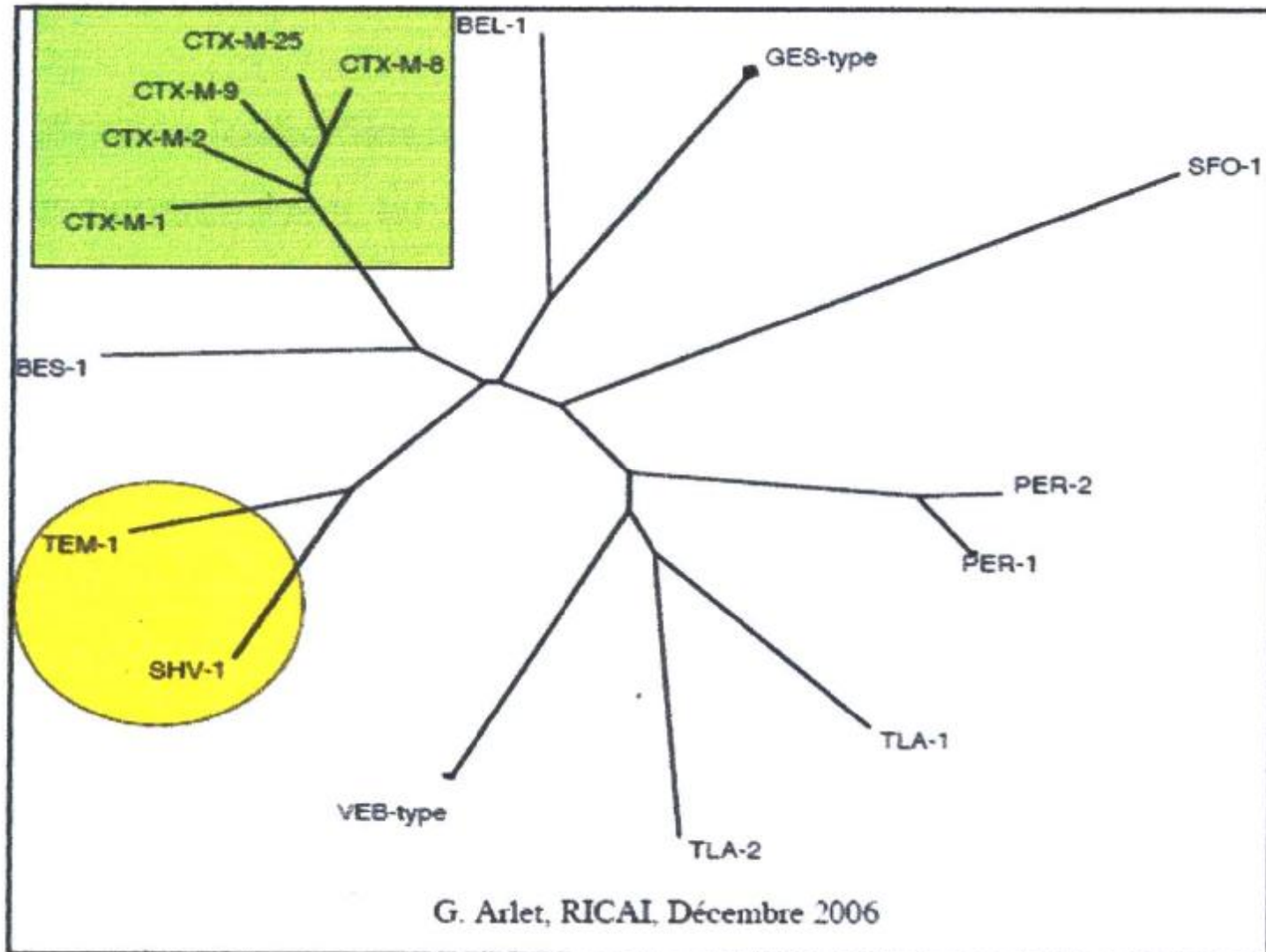


Figure 1 : Nouvelles BLSE

HISTORIQUE DES BETALACTAMASES :

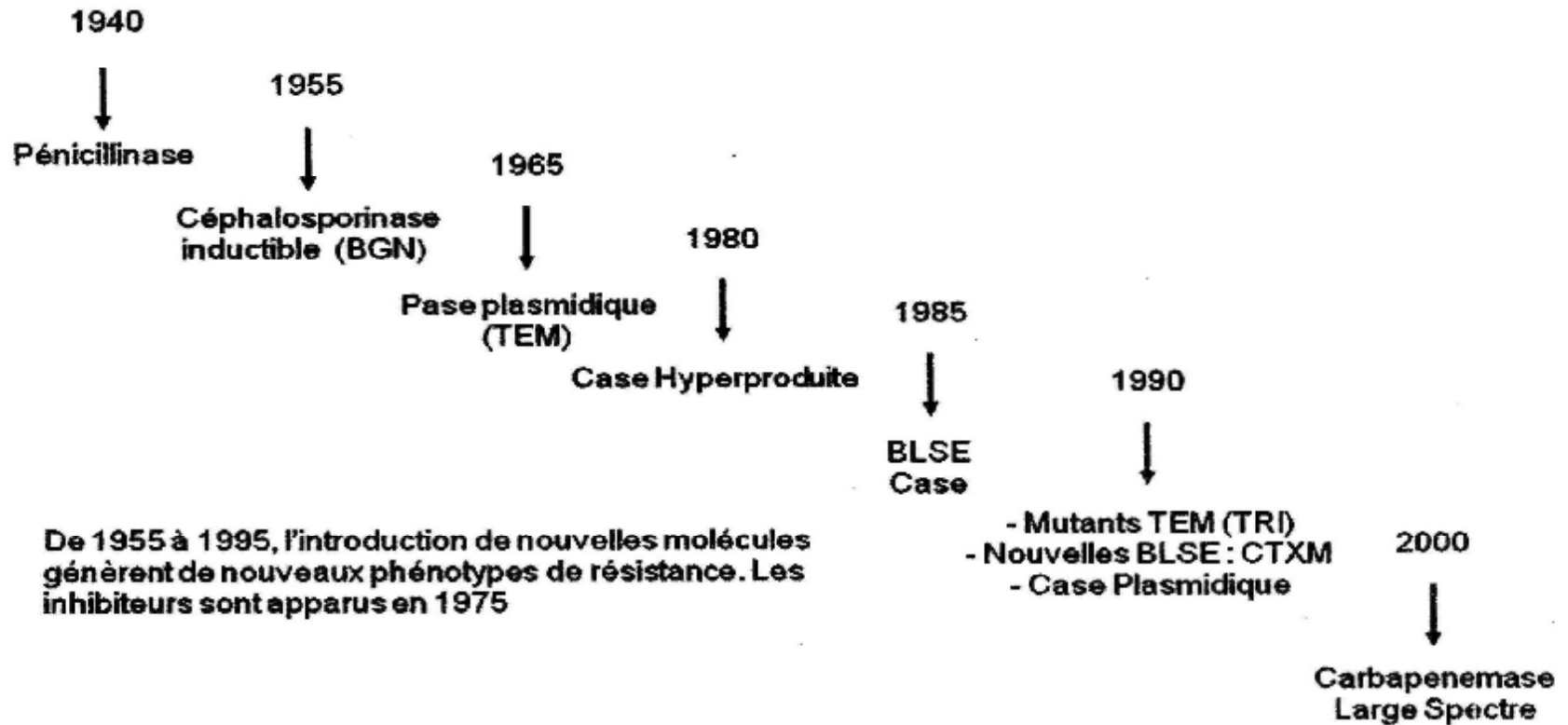


Figure 2 : Historique des β -Lactamases

Le tableau 3: classification structurale et fonctionnelle des β -lactamases d'après Ambler et Bush (Bonnet, 2006)

Classification		Enzyme	Activité enzymatique préférentielle							Activité inhibitrice	
Structurale d'Ambler	Fonctionnelle de Bush		Pénicilline	Carboxypénicilline	Oxacilline	C1Ga	C3G	Aztréonam	Imipénème	Clavulanate	EDTA
Enzyme à sérine active											
A	2a	Pénicillines à spectre restreint	+++	++	-	+/-	-	-	-	+++	-
	2b	Pénicillines à large spectre	+++	++	+	++	-	-	-	+++	-
	2be	β -lactamases à spectre étendu	+++	++	+	++	++	++	-	+++	-
	2br	TEM résistantes aux inhibiteurs	+++	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	2c	Carbénicillines	++	+++	+	+	-	-	-	+	-
	2e	Céfuroximes	++	++	-	++	+	-	-	+++	-
	2f	Carbapénèmes	++	+	?	+	+	++	++	+	-
C	1	Céphalosporines	++	+	-	+++	+	-	-	-	-
D	2d	Oxacillines	+	+++	v	V	-	-	V	-	-
Métallo-enzyme à zinc											
B	3	Carbapénèmes	++	++	++	++)+	-	++	-	++

Les marqueurs épidémiologiques

La survenue de cas groupés d'infections dues à des bactéries de la même espèce peut être la conséquence de la diffusion épidémique de la même souche ou peut être l'addition de groupes indépendants d'infections dues à des souches différentes.

C'est pour distinguer ces deux situations que l'étude des marqueurs épidémiologiques est généralement mise en œuvre (Armengaud, 2003).

En pratique usuelle, un laboratoire de bactériologie identifie les souches pathogènes au niveau de l'espèce : *K.pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, etc....Au sein de chacune de ces espèces, la diversité génétique des souches permet de reconnaître différents clones. Les typages par détermination des marqueurs épidémiologiques, en raison de leur coût, ne sont réalisés que chez les souches de même espèce suspectées d'avoir une origine commune et donc une diffusion épidémique (Bourlioux, 1990; Avril, 1998)

Classification des marqueurs

Ils sont classés en deux grands groupes :

Les plus classiques sont les marqueurs phénotypiques qui prennent en compte les caractères exprimés par les microorganismes et les marqueurs génotypiques qui analysent le génome, qu'il soit chromosomique ou non chromosomique.

1. Les marqueurs phénotypiques

Ils sont faciles à mettre en œuvre, en revanche ils sont très fortement influencés par les conditions (facteurs environnementaux) qui exercent sur eux une pression sélective. Exp : les antigènes influencés par les anticorps produits lors des réponses immunitaires, ou la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif influencée par la présence des antibiotiques dans le milieu où vit le germe.

C'est à cause de la pression sélective qu'il est nécessaire de trouver des marqueurs neutres vis à vis de la sélection naturelle.

1.1. Le biotype :

Il est basé essentiellement sur l'étude de l'activité métabolique des souches (utilisation des sucres, activité enzymatique)

Peu reproductible, il ne doit pas être utilisé seul à moins de disposer de galerie miniaturisée de 50 tests (Meunier et al., 1997; Monteil, 1999)

1.2. L'antibiotype :

L'antibiogramme est la technique réalisée quotidiennement au laboratoire sur toutes les souches isolées. L'antibiotype est un marqueur très utile lorsqu'il concerne un profil particulier et nouveau. L'inconvénient majeur auquel est confronté l'antibiogramme est le fait que les souches hospitalières épidémiques résistent à la majorité des antibiotiques (Avril et Donnio, 1998). Cependant l'étude des marqueurs de résistance aux antibiotiques des souches bactériennes reste une étape incontournable d'abord pour la décision thérapeutique et pour le suivi des souches agents d'épidémies, car en multipliant les marqueurs on affûte le pouvoir discriminant de la technique. En règle générale, dans un laboratoire de diagnostic microbiologique, la suspicion d'une épidémie débute après l'isolement de 2 à 3 souches de la même espèce ayant le même antibiotype, isolées dans le même service, dans un laps de temps court.

1.3. Le sérotype :

Il fait appel aux sérums immuns des antigènes de surface des bactéries, la détermination des antigènes somatiques O, la détermination des antigènes capsulaires permet une caractérisation des souches et c'est la méthode la plus largement utilisée pour le typage des *K.pneumoniae* (Hansen et al., 1999; Fung et al., 2000). L'inconvénient est que les antisérums sont coûteux. Chez *K.p* au moins 77 antigènes K et plus de 12 antigènes O ont été décrits. Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent au type capsulaire 1 et 2, plus rarement 3 et 4 K (Eyquem et al., 1998^a; Struve et al., 2003).

1.4. Le lysotype :

Il détermine la résistance ou la sensibilité des souches à une gamme de bactériophages. La sensibilité est due au fait que la souche possède des récepteurs spécifiques. Pour la *K.p* le lysotype a été développé dans les années 1960 (Birge, 1994) mais n'est jamais devenu

courant. L'inconvénient est la difficulté de maintenir les stocks de phages biologiquement actifs et les souches de contrôle tests (Avril et Donnio, 1998).

1.5. Le bactériocinotype :

Tout comme la lysotypie, il s'agit là d'une technique lourde réalisée dans les laboratoires de référence. Beaucoup d'auteurs recommandent le typage de la *K.p* via bactériocines. La bactériocinotypie étudie la sensibilité à des bactériocines.

Les bactériocines sont des substances bactéricides communément des protéines produites par des bactéries pour inhiber la croissance d'autres bactéries, souvent membres des mêmes espèces (Grimont et al., 2007). La synthèse des bactériocines n'est pas assez fréquente chez *K.p* ce qui fait de cette technique la méthode de choix pour le bactériocinotype des organismes appartenant à ce genre (Birge, 1994; Podschun et Ullmann, 2000)

1.6. L'électrophorèse des protéines et immunoblotting :

Les variations de structure des protéines totales ou des protéines de surface bactériennes peuvent-être analysées par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide après dénaturation des constituants bactériens par le lauryl sulfate de sodium dodecyl sulfate (SDS-Page). Les protéines sont ensuite détectées dans le gel soit directement par coloration, soit indirectement par immuno-blot. L'avantage de cette technique est de pouvoir typer toutes les bactéries, mais son inconvénient, surtout lorsqu'elle n'est pas suivie d'immunoblotting, est de donner parfois trop de bandes ce qui a pour conséquence une lecture et une interprétation difficiles (Avril et Donnio, 1998).

2. Les marqueurs génotypiques

C'est l'analyse de l'ADN total, chromosomique ou extra chromosomique.

2.1. Etude du polymorphisme enzymatique par méthode électrophorétique ou Multilocus Enzyme Electrophorésis (MEE) :

Cette méthode consiste à séparer les protéines par migration en gel puis à détecter chaque enzyme par son activité vis à vis de son substrat spécifique. Pour chaque enzyme

étudiée, les différents variants de mobilité de cette enzyme, appelés alloenzymes, sont mis en évidence (Robicsek et al., 2006).

Une souche est caractérisée par une combinaison d'alloenzymes appelée type électrophorétique ou zymotype. On distingue jusqu'à plus de 90 types d'estérases chez les Enterobacteriaceae (Freney et al., 2000).

2.2. Analyse du contenu plasmidique :

Les plasmides sont des ADN circulaires extra chromosomiques situés dans le cytoplasme bactérien. Ils codent pour des mécanismes de résistances aux antibiotiques, pour des caractères métaboliques et des facteurs de virulence (Nicklin et al., 2000; Galani et al., 2002). Les plasmides dits cryptiques n'ont pas de fonction connue. En revanche toutes les souches n'hébergent pas de plasmides. L'analyse du contenu plasmidique est la plus simple des techniques d'épidémiologie moléculaire, cependant le contenu est instable puisqu'une souche peut acquérir ou perdre des plasmides. De plus des souches différentes peuvent héberger des plasmides identiques (Rodriguez-Martinez et al., 2003).

L'ADN plasmidique peut-être séparé de l'ADN chromosomique par ultracentrifugation. Les plasmides peuvent aussi être séparés entre eux en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse en gel d'agarose, après dénaturation de l'ADN chromosomique à pH 13.5, ou par la chaleur, ce qui permet de déterminer leur nombre et leur taille (Nicklin et al., 2000).

Un traitement préalable par une enzyme de restriction, coupant des plasmides différents en des sites variés permet de distinguer des plasmides différents mais de même taille.

2.4. Techniques d'hybridation

Après avoir séparé le chromosome par électrophorèse en gel d'agarose les fragments produits par les coupures des enzymes de restriction, ceux-ci sont transférés sur une membrane de cellulose ou de nylon. En utilisant ensuite des sondes d'ADN marqué, seules seront visibles les bandes d'ADN chromosomique s'hybridant avec la sonde. Le nombre de fragment est donc considérablement réduit. Il varie avec le nombre de loci qui sont homologues à la sonde. Leur localisation varie avec celle des sites de coupures des endonucléases (Barouton et al., 1995; Freney et al 1998)

2.4.1. Sonde reconnaissant l'ADN codant pour l'ARN ribosomal. (Ribotypie)

La ribotypie est une technique utilisée pour documenter des épidémies dues à de nombreuses espèces de bactéries responsables d'infections nosocomiales

La ribotypie décrite par P.A.D. Grimont, utilise des sondes reconnaissant les loci d'ADN codant pour l'ARN ribosomal (r RNA) 16 S et 23 S (Mena et al., 2006; Perichon et al., 2007). Elle a deux avantages : d'une part, les gènes codant pour le r RNA sont identiques dans le monde des eubactéries, ce qui permet l'utilisation d'une sonde universelle, d'autre part, la majorité des espèces bactériennes possèdent plusieurs copies de l'opéron ribosomal (rrn).

2.4.2. Hybridation avec d'autres sondes

La découverte de séquences d'insertion (i s) ou éléments transposables répétitifs a permis, la réalisation de sondes spécifiques de ces i s. La standardisation de cette technique en utilisant la séquence d'insertion i s 6110 permet la comparaison des résultats obtenus dans différents laboratoires, et c'est aussi un outil pour établir le caractère nosocomial de certaines tuberculoses (Avril et Donnio, 1998).

2.5. Electrophorèse en champ pulsé ou Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PEFGE est considérée comme l'étalon-or des méthodes de typage moléculaire, comparé à d'autres méthodes, elle offre souvent un pouvoir de discrimination supérieur (Singleton, 2005).

En pratique, l'ADN chromosomique des souches étudiées doit être préparé sans subir de coupures. Les bactéries sont incluses dans des blocs d'agarose. Elles y sont traitées par des enzymes et des détergents de façon à ce que seul l'ADN intact reste inclus dans les blocs, l'ADN est alors soumis à des enzymes de restriction choisies en fonction de l'espèce bactérienne de façon à obtenir un nombre de fragments d'ADN, inférieur à 20. La séparation des fragments est alors réalisée par migration dans un gel d'agarose soumis au champ pulsé. L'ensemble des fragments obtenus est caractéristique de chaque souche analysée dont il constitue le << pulsotype >> (D'Agata et al., 2001; Pimkin et al., 2002).

Au cours d'une situation épidémique, ou supposée telle, la procédure recommandée est la suivante :

- Identifier les isolats dont le pulsotype montre clairement qu'ils sont uniques et non reliés aux autres.
- Classer comme sous-types d'une même souche les isolats ayant des pulsotypes voisins, mais différents (dont la différence porte sur trois bandes au plus), et considérer comme distincts les isolats dont les pulsotypes se différencient par plus de trois bandes.

Lorsque des doutes subsistent concernant le fait que des souches sont reliées ou non, la prudence consiste à considérer qu'elles sont reliées, de façon à en tenir compte dans un plateau visant à contrôler la diffusion épidémique de ces souches (Meunier et al., 1997).

L'électrophorèse en champ pulsé est une technique qui a de nombreux avantages :

- Pour une souche donnée le pulsotype est stable et reproductible (Singleton, 2005). Elle analyse la totalité de l'ADN chromosomique.
- Elle s'est montrée discriminante par le polymorphisme observé chez toutes les espèces bactériennes étudiées.

Ces avantages font que, malgré son coût, l'électrophorèse en champ pulsé est une technique appelée à se développer d'autant plus facilement que des kits de réactifs appropriés en fonction de l'espèce bactérienne à examiner sont mis sur le marché (Prévost et al 1993; Hansen et al., 2002). Nous avons adopté cette technique dans notre étude.

2.6. Typage après amplification par PCR

La technique d'amplification génomique par réaction de polymérisation en chaîne est connue pour son efficacité comme méthode diagnostique. Il existe deux modalités d'application de la PCR au typage bactérien (Eyquem et al., 1998)b.

2.6.1. Amplification à partir de séquences connues :

2.6.1.1. Amplification spécifique à partir de séquences répétées (REP-PCR) :

Deux séquences conservées et répétées du génome bactérien ont été décrites chez les entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif : les séquences REP (Repetitive Extra Palindromic) et les séquences ERIC

(Enterobacterial Repetitive intergenic consensus). Ces séquences aux fonctions inconnues, peuvent être utilisées comme sites de liaison aux amorces dans la réaction PCR (REP-PCR ou ERIC-PCR) pour produire des profils différents (Noah et al., 2001).

2.6.1.2. PCR-ribotypage

Cette technique utilise des amorces codant pour les ARN 16 S et 23 S. Elle permet de détecter le polymorphisme dans les régions intergéniques 16 S et 23 S.

2.6.2. Amplification au hasard ou arbitrarily primed PCR (AP-PCR) ou Random Amplification of polymorphic DNA (RAPD) :

Elle consiste à amplifier par PCR des fragments du génome en utilisant comme amorce des séquences choisies au hasard. Les amorces choisies, d'une dizaine de bases et d'un % G+C > 40, se répartissent sur le génome bactérien. Lorsque les deux amorces ont trouvé des homologies le fragment d'ADN qui les sépare est amplifié par PCR. Les produits d'amplification sont alors directement analysés par électrophorèse (Brise et Verhoef, 2001; D'Agata et al., 2001) .

Cette technique a de nombreux avantages :

- Elle ne nécessite pas d'informations sur la séquence cible.
- Elle est discriminante et a de nombreuses applications.
- Elle ne nécessite pas d'enzyme de restriction et de ce fait un coût moindre que beaucoup d'autres techniques.

Le typage des souches renseigne sur l'ampleur de la dissémination d'une souche clonale, le nombre de souches clonales, l'origine des contaminations et les vecteurs de transmission, ainsi que les facteurs de risque d'infection et de transmission des souches nosocomiales.

Conclusion :

Au total, les techniques bactériologiques actuelles permettent avec un grand pouvoir discriminant de comparer entre elles les souches appartenant à la même espèce et de confirmer ou d'écarter l'hypothèse de la diffusion épidémique d'une même souche. Mais ce n'est qu'une étape descriptive en soi, elle est sans efficacité, si elle n'est pas suivie par l'établissement et l'observance de mesures préventives de la diffusion des infections nosocomiales.

Principales familles des antibiotiques actifs sur les BGN et leur mode d'action:

Ces informations sont importantes pour comprendre les mécanismes biochimiques et génétiques de la résistance.

Chaque famille d'antibiotiques possède son site d'action propre au métabolisme des bactéries.

1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane ou paroi bactérienne

Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par des antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. Il en résulte une altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie.

β -lactamines

Elles ont en commun un noyau β -lactame présentent une analogie structurale avec la terminaison D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane. Elles se fixent de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Ces protéines sont des enzymes impliquées dans la phase finale de la synthèse du peptidoglycane, c.a.d l'étape de polymérisation à partir de sous unité faites d'un disaccharide-peptide (Bonet, 2006).

L'activité enzymatique des PLP est inhibée par leur liaison avec les β -lactamines. Une bactérie contient plusieurs variétés de PLP. L'affinité des β - pour les PLP est variable en fonction des β -lactamines et en fonction des PLP.

Les β -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. Il existe de nombreuses variétés de β -lactamines qui se distinguent par leur spectre d'activité et leurs propriétés pharmacologiques (Jarlier, 1995; Jarlier et Nordman, 2000).

Parmi les β -lactamines on distingue:

Les pénicillines, les céphalosporines, les associations avec les inhibiteurs des β – lactamases, les carbapénèmes, , et les monobactames (Dabernat, 1995).

2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

2.1. Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome

2.1.1. Aminosides ou aminoglycosides

La streptomycine fut le premier antibiotique de cette famille. Actuellement les plus utilisés sont la gentamicine, la tobramicine, l'amikacine, et la netilmicine. Les aminosides ne sont guère utilisés en monothérapie, le plus souvent ils sont associés aux β –lactamines avec lesquelles ils exercent un effet synergique.

La streptomycine et la kanamicine ne sont plus guère utilisées en clinique.

Les aminosides sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines qui exercent des effets pléiotropes sur la bactérie. Ce sont des antibiotiques bactéricides. Ils inhibent la traduction aux stades d'initiation, d'élongation et de terminaison. Leur cible est l'ARN 16S du ribosome bactérien. Il a été établi il y'a de nombreuses années que l'effet inhibiteur des aminosides était dû à leur fixation sur la sous unité 30S du ribosome (Lambert et Courvalin, 2000; Lambert, 2006).

2.1.2. Tétracyclines

Cette famille d'antibiotiques exerce une activité bactériostatique. Ce sont des antibiotiques à large spectre. De nombreuses souches présentent des résistances du fait de leur utilisation dans le passé. Actuellement elles sont considérées comme simple marqueur phénotypique pour les Enterobactéries (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1995).

2.2. Antibiotiques se fixant sur la sous –unité 50S du ribosome

- **Chloramphénicol :**

Simple marqueur phénotypique pour les BGN, sauf les Salmonelles et les Shigelles. C'est un antibiotique à large spectre, à effet bactériostatique, très actif pour le traitement de la fièvre typhoïde, actuellement il est peu commercialisé en raison de sa toxicité (Singleton, 2005).

3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques

3.1. Sulfamides et triméthoprime

Les sulfamides sont des analogues de l'acide para-aminobenzoïque. Ils inhibent la synthèse des folates en inhibant la dihydroptérate synthétase, d'où leur action sur la synthèse d'acides nucléiques. Ils sont peu utilisés actuellement en raison de leurs nombreux effets secondaires et la fréquence des souches résistantes, puisqu'ils ont été les premiers agents antimicrobiens utilisés.

Le triméthoprime inhibe la synthèse des folates en inhibant la dihydrofolate réductase. C'est un agent à large spectre, utilisé essentiellement en association avec un sulfamide (effet synergique) (Singleton, 2005).

3.2. Quinolones

Elles inhibent des topoisomérases, enzymes intervenant dans la conformation de l'ADN, et plus particulièrement la topoisomérase II (ou ADNgyrase) et la topoisomérase IV.

Elles se fixent sur le complexe formé par la topoisomérase et l'ADN (Jacoby et al., 2003).

Les quinolones de première génération dont le chef de file est l'acide nalidixique, n'agissent que sur les bacilles à Gram négatif et ne sont utilisées que dans le traitement des infections urinaires.

Les quinolones de 2ème génération ou fluoroquinolones comprennent principalement la pefloxacin, l'ofloxacin et la ciprofloxacine. Elles sont bactéricides et sont 100fois plus actives que celles de la 1ère génération (Bryskier, 1999).

4. Antibiotiques agissant sur les membranes

4.1. Polymyxines

Elles se fixent sur les membranes bactériennes et les désorganisent. Antibiotiques à effet bactéricide. La colistine est l'antibiotique le plus utilisé. Elle n'agit que sur les bacilles à Gram négatif (Singleton, 2005).

4.2. Nitrofuranes

Ce sont des produits à large spectre. La nitrofurantoïne est utilisée exclusivement dans les infections urinaires (Nauciel, 2000).

Résistance aux antibiotiques

1. Généralités

Les antibiotiques ont été la révolution du vingtième siècle pour le traitement des maladies infectieuses bactériennes. Ils sont indispensables et personne ne songerait à discuter leurs indications pour le traitement des infections. Mais il est clair que leur facilité d'utilisation, l'habitude de traiter des maladies supposées infectieuses a conduit à la généralisation de l'usage des antibiotiques dans des circonstances cliniques qui ne se justifient pas (Gastmeier et al.,2000). Les effets indésirables sont nombreux, immédiats, individuels, secondaires et collectifs, comme il a été rapporté dans l'argumentaire de l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, paru dans Médecine et Maladies Infectieuses 2002 : 32 ; 134-58. Des recommandations ont été élaborées concernant la prescription. **Prescrire moins, prescrire mieux.**

La situation est critique en médecine d'hôpital car les bactéries sont alors soumises à une pression antibiotique constante entraînant une évolution vers des résistances de plus en plus importantes, c'est le cas avec les BGN dont *K.pneumoniae* qui constitue l'espèce bactérienne multi résistante la plus fréquemment isolée au CHU de Constantine. Les mécanismes génétiques et biochimiques, responsables de la résistance des bactéries aux antibiotiques, permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de la résistance (apparition et diffusion des gènes de résistance et des souches résistantes) et de mieux appréhender les facteurs responsables de la sélection des souches résistantes. Sur le plan génétique, la résistance des bactéries aux antibiotiques résulte soit d'une résistance naturelle soit d'une résistance acquise.

2/ Les niveaux de résistance

D'un point de vue bactériologique, on dit qu'une souche est résistante lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que la concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce.

On parle de **bas niveau de résistance** si la croissance est stoppée par de faibles concentrations d'antibiotique et de **haut niveau de résistance** si de fortes concentrations sont nécessaires.

2. Les phénotypes de résistance

Quand on étudie la sensibilité d'une souche à plusieurs antibiotiques, on détermine son **phénotype de résistance** aux antibiotiques. Si la souche n'exprime que des résistances naturelles, on dit qu'elle appartient au phénotype "sauvage" ou sensible. Si des résistances acquises ont modifié sa sensibilité, elle exprime un phénotype de résistance qu'on peut identifier et dont on doit tenter de déterminer le mécanisme.

Ces phénotypes sont souvent désignés par les initiales des antibiotiques devenus inactifs : ainsi une souche résistante à la kanamycine, à la tobramycine et à la gentamicine appartient au phénotype KTG.

3. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de toutes les souches alors que la résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Inversement, la résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (Fauchère et Avril, 2002). Ses mécanismes biochimiques sont nombreux et quelques uns d'entre eux sont cités ci-dessous.

§ Les bacilles à Gram négatif (et notamment les entérobactéries dont *K.p* et *Pseudomonas aeruginosa*) sont naturellement résistants, le plus souvent à bas niveau, aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G,

pénicilline M, macrolides, rifampicine, acide fusidique, novobiocine, vancomycine) car ces antibiotiques ne peuvent traverser la membrane externe de la paroi. *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'amoxicilline, ampicilline et à la ticarcilline, grâce à une β -lactamase chromosomique naturelle (Pina et al., 2000).

- § Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies. Pour les mêmes raisons, les bactéries aéro-anaérobies facultatives sont moins sensibles aux aminosides lorsqu'elles sont placées dans un environnement pauvre en oxygène (Euzéby, 2009).
- § Certaines espèces (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardia* spp., ...) produisent naturellement des β -lactamases.

4. Résistance acquise

Elle existe grâce à l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance qui déterminent un phénotype bien précis de résistance, différent du phénotype sauvage, caractérisant les souches n'ayant pas acquis ce mécanisme. Elle ne concerne qu'une population plus ou moins importante de souches d'une espèce.

La résistance acquise a été observée dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était faible. Ultérieurement, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes et on constate, quotidiennement, que de très nombreuses souches ne se comportent pas à l'égard des antibiotiques conformément à ce que les spectres d'activité permettraient de le supposer. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques (Ros, 1999; Meyer et al., 2004).

5. Résistance croisée et Co-résistance

La résistance croisée résulte d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques appartenant à la même famille (Euzéby, 2009)

La Co-résistance est liée à plusieurs mécanismes (plusieurs gènes de résistance impliqués) et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles (Podglajeu 2006).

6. Mécanismes génétiques de la résistance acquise

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué d'une part d'un génophore obligatoire, le chromosome et d'autre part de un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique (Tigaud, 2000).

6.1. Résistance chromosomique

Elle ne concerne que 10% des résistances acquises. La résistance chromosomique résulte d'une mutation dont elle en présente tous les caractères.

6.2. Résistance extra-chromosomique

Elle concerne 90% de résistance acquise, la résistance acquise souvent médiée par un élément génétique transposable (plasmide, transposon) a la faculté de se transmettre horizontalement parfois entre espèces différentes, entraînant par exemple une épidémie de plasmide. La transmission verticale existe aussi.

6.2.1. Plasmides

Les premiers plasmides de résistance aux antibiotiques ont été décrits au Japon à la fin des années 1950, lors d'une épidémie de dysenterie bacillaire à *Shigella flexneri*. Depuis cette date, des plasmides de résistance ont été retrouvés chez de très nombreuses espèces et on a constaté que la résistance plasmidique concerne de très nombreux antibiotiques (Bush, 1994).

§ La résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. Les bactéries porteuses de plasmides sont normales alors que les bactéries résistantes par mutation sont souvent fragilisées. Aussi, les bactéries porteuses de plasmides ne sont pas ou peu contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique (Birge, 1994; Nicklin et al., 2000).

§ De nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal par conjugaison ou mobilisation. Les plasmides conjugatifs ou non conjugatifs peuvent également être transmis par transduction (transfert par l'intermédiaire d'un bactériophage) ou par transformation (pénétration dans une bactérie réceptrice d'ADN libre). Ces transferts sur un mode horizontal par conjugaison, mobilisation, transduction et transformation sont à l'origine d'une dissémination très importante au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de contagieuse ou d'infectieuse. Cette dissémination des gènes de résistance est exacerbée par la présence d'éléments génétiques transposables et d'intégrons (Le Minor, 1982)

6.2.2. Éléments génétiques transposables et intégrons

L'importance des éléments génétiques transposables et des intégrons inclus dans les transposons est considérable.

Les plasmides de résistance sont susceptibles d'évoluer par acquisition ou pertes successives de déterminants de résistance portés par des éléments génétiques transposables. Les éléments génétiques transposables expliquent que certains plasmides soient construits de façon modulaire. Ainsi, le plasmide R1 possède les gènes codant pour la résistance à 5 antibiotiques différents. Ce plasmide résulte de

l'acquisition par un plasmide apparenté au facteur F, d'un transposon codant pour la résistance au chloramphénicol, d'un transposon codant pour la résistance à la kanamycine et du transposon Tn4 qui code pour la résistance à la streptomycine et aux sulfamides et qui héberge lui même le transposon Tn3 porteur d'un gène de résistance pour l'ampicilline (Fauchère et Avril, 2002).

Les éléments génétiques transposables permettent la dissémination de gènes entre des bactéries phylogéniquement éloignées en permettant l'implantation d'un gène là où celle d'un plasmide échoue.

§ Les plasmides des entérobactéries peuvent se transmettre à des espèces de la famille des *Pasteurellaceae* mais les plasmides transférés ne peuvent pas se répliquer dans les cellules réceptrices. Si le plasmide transféré possède des éléments transposables, ceux ci peuvent s'intégrer dans une molécule d'ADN de la bactérie hôte, par exemple un plasmide. Ainsi engendré, ce plasmide modifié pourra se transmettre entre souches de la même espèce ou entre des souches d'espèces différentes mais phylogéniquement proches (Birge, 1994; Nicklin et al., 2000).

Comme pour la résistance chromosomique, les gènes de la résistance extra-chromosomique ne sont pas induits par l'utilisation des antibiotiques qui se contentent de sélectionner les bactéries porteuses de tels gènes. Il est important de noter que la résistance extra-chromosomique étant souvent une multi-résistance, l'utilisation d'un seul antibiotique va sélectionner des bactéries multi-résistantes qui ne sont pas contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique (Harbarth et Cameli, 2001; Haeggman et al., 2004).

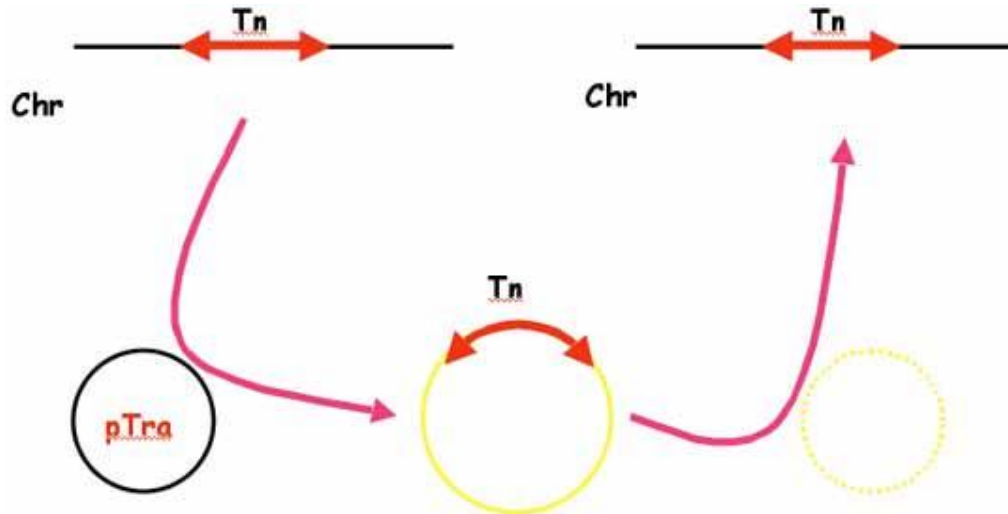


Figure 4: Mobilisation d'un transposon (Tn) d'une bactérie donatrice à gauche à une réceptrice par conjugaison (<http://www.onerba.org/>) Claire Poyart...

7. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise

Les mécanismes biochimiques de la résistance acquise peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes : (i) diminution de la perméabilité et efflux actif, (ii) modification de la cible des antibiotiques et (iii) production d'enzymes inactivant les antibiotiques et ce dernier mécanisme est le plus fréquent.

Les principaux mécanismes biochimiques sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Principaux mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques actifs sur les BGN (Jehl et al., 2003)

Antibiotiques	Résistance chromosomique	Résistance extra-chromosomique
Aminosides	Diminution de la perméabilité Modification de la cible (protéine S12 de la sous-unité 30 S)	Inactivation enzymatique par des acétyltransférases, des nucléotidyltransférases et des phosphotransférases
Bêta-lactamines	Diminution de la perméabilité Diminution d'affinité des PLP Augmentation de la synthèse des PLP Synthèse de nouvelles PLP Inactivation enzymatique par des céphalosporinases	Inactivation enzymatique par diverses bêta-lactamases
Phénicolés	Diminution de la perméabilité	Efflux actif spécifique Inactivation enzymatique par des chloramphénicol acétyltransférases
Quinolones	Diminution de la perméabilité Modification de la cible (gène <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> ou <i>parC</i>)	
Sulfamides	Diminution de la perméabilité Modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase	Dihydroptéroate synthétase additionnelle et sans affinité pour les sulfamides
Triméthoprime	Diminution de la perméabilité- Modification par mutation de la dihydrofolate réductase	Dihydrofolate réductase additionnelle et insensible au triméthoprime

7.1. Diminution de la perméabilité et efflux actif

7.1.1. Diminution de la perméabilité

Une diminution de la perméabilité résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines c'est pourquoi elle concerne les BGN. C'est chez *Escherichia coli*, les *Enterobacter* spp, les *Serratia* spp, les *Klebsiella* spp et *Pseudomonas aeruginosa* que ce mécanisme a le plus d'importance : une ou plusieurs modifications des porines sont à l'origine d'une résistance acquise aux bêta-lactamines, aux quinolones, au chloramphénicol, aux sulfamides, au triméthoprime et aux tétracyclines (Pleïsiat et Zhha-Zarifi, 1996; Fauchère et Avril, 2002).

Dans le cas des aminosides, l'imperméabilité résulte d'un mécanisme différent. Elle est due à des mutations modifiant le système de transport actif de ces molécules et provoquant une diminution d'activité de tous les aminosides. C'est alors une modification de la membrane cytoplasmique.

7.1.2. Efflux actif

Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines particulières, jouant le rôle de pompes utilisant une force protons motrice pour expulser l'antibiotique dès qu'il apparaît dans la bactérie.

Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques. Ainsi, la mutation des gènes marRAB d'*Escherichia coli* entraîne une résistance aux quinolones, au chloramphénicol et aux tétracyclines.

Une acquisition de gènes peut être à l'origine de systèmes d'efflux spécifiques. Contrairement aux systèmes d'efflux multi-drogues, les systèmes d'efflux spécifiques ne permettent que l'exportation de molécules apparentées (Poole, 2004).

§ Le premier exemple connu de résistance acquise par efflux transmembranaire spécifique est celui des tétracyclines. Des transposons (Tn 10 et Tn 1721) codent pour des protéines (protéines Tet) qui exportent les tétracyclines à

travers la membrane cytoplasmique. Selon les protéines Tet synthétisées, la résistance concerne toutes les tétracyclines sauf la minocycline ou toutes les tétracyclines y compris la minocycline.

§ Le gène cassette *cmlA*, initialement décrit chez *Pseudomonas aeruginosa* et inclus dans le transposon Tn 1696, code également pour un système d'efflux spécifique concernant le chloramphénicol et le florfénicol.

Par la suite, de nombreux autres gènes homologues de *cmlA*, portés par des transposons ou des plasmides, ont été identifiés chez diverses bactéries (entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Staphylococcus lentus*).

- Le meilleur exemple de résistance par efflux pour les BGN concerne la résistance aux quinolones due à une surexpression d'une pompe à efflux naturelle médiée par des protéines membranaires (Quentin et al., 2004). Chez *K.pneumoniae* c'est le gène *acrR^P* qui code pour un système de pompe à efflux (Poole, 2004).

7.2. Modification de la cible des antibiotiques

7.2.1. Modification des PLP

Les PLP ou protéines liant les pénicillines sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane et elles sont la cible des β -lactamines. Une modification des PLP est principalement décrite chez les bactéries à Gram positif et, beaucoup plus rarement, chez des bactéries à Gram négatif comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae*. La modification d'affinité des PLP résulte de : la Synthèse d'une ou de plusieurs nouvelles PLP insensibles aux bêta-lactamines (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) et liée à l'acquisition de nouveaux gènes.

Dans le cas des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline, l'acquisition et l'intégration dans le chromosome d'un gène (*mecA*), d'origine mal connue, induit la synthèse d'une nouvelle PLP (la PLP 2a). La PLP 2a est capable d'assurer à elle seule l'assemblage du peptidoglycane et elle confère une résistance à toutes les bêta-lactamines.

Dans le cas de *Streptococcus pneumoniae* la résistance est liée à diverses recombinaisons chromosomiques avec des gènes provenant d'autres streptocoques. Au moins quatre des cinq PLP de haut poids moléculaire peuvent être modifiées par rapport aux souches sensibles (Fauchère et Avril, 2002).

7.2.2. Modification de la cible des quinolones

Des mutations dans le gène *gyrA* peuvent modifier la sous unité A de l'ADN gyrase (une des cibles des quinolones) et diminuer l'affinité des quinolones pour leur cible ce qui provoque une résistance croisée, à des degrés divers, pour l'ensemble des quinolones (Jarlier, 2001). Ces modifications sont situées dans la sous-unité A au niveau d'un domaine d'environ 40 acides aminés et nommé "région déterminant la résistance aux quinolones (ou QRDR : Quinolone Resistance-Determining Region). Ces modifications, étudiées notamment chez *Escherichia coli* (substitution des acides aminés 83 et 87), confèrent une résistance qui atteint de 10 à 100 fois la CMI. L'association de deux mutations aboutit à de hauts niveaux de résistance (plus de 100 fois la CMI) et inclut les fluoroquinolones (Robicsek, 2006).

Des mutations dans le gène *gyrB* (codant pour la sous-unité B de l'ADN gyrase) peuvent modifier les acides aminés 426 ou 447 chez *Escherichia coli* ou les acides aminés 437 ou 458 chez *Staphylococcus aureus* (ces acides aminés déterminent le QRDR de la sous-unité B) (Soussy, 1994; Anderson et Mac-Gouwan, 2003). L'association d'une mutation dans le gène *gyrA* et dans le gène *gyrB* a été observée chez une souche de *Staphylococcus aureus*.

In vivo, les mutations du gène *gyrA* sont beaucoup plus fréquentes que celles du gène *gyrB*.

Il existe depuis peu de temps des plasmides de résistance aux quinolones qui codent pour une protéine protégeant la cible de quinolones. La résistance plasmidique aux quinolones a été découverte lors de l'exploration de la résistance aux β -lactamines chez une souche de *K.pneumoniae* dont les transconjugants exprimaient une augmentation de la CMI des fluoroquinolones de 32 fois. Il a été ensuite démontré que le plasmide pMG52 hébergeait le gène *qnr* codant pour une protéine, QNR, de 218

acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés. QNR entre en compétition avec les quinolones pour la fixation à l'ADN gyrase (Tran et Jacoby, 2002; Robicsek et al., 2006).

La résistance conférée par *qnrA* est de bas niveau (CMI de la ciprofloxacine= 0.125-2 µg/mL) difficilement détectable par l'antibiogramme. La détection repose donc sur des techniques de biologie moléculaire (Nordman et Mammeri, 2007) Ce mécanisme est à surveiller à l'avenir car facilement transmissible.

7.2.3. Modifications des cibles des sulfamides et du triméthoprime

La substitution de cible est un des mécanismes de résistance observés avec les sulfamides et le triméthoprime. Il résulte de l'acquisition de plasmides codant pour une dihydroptéroate synthétase ou une dihydrofolate réductase, ayant un rôle physiologique identique à celui des enzymes codées par le chromosome mais insensibles à l'agent antibactérien. Ces bactéries produisent donc des enzymes chromosomiques sensibles et des enzymes plasmidiques résistantes.

Une modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase ou de la dihydrofolate réductase confère, respectivement, une résistance aux sulfamides ou au triméthoprime (Brige, 1994; Fauchère et Avril, 2002).

7.3. Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques

- Ce mécanisme nous intéresse particulièrement pour notre étude, vu que *Klebsiella pneumoniae* est très concernée par les β -lactamases et sachant aussi que la première souche découverte produisant une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) appartient à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Enfin des mécanismes différents de résistance aux mêmes molécules peuvent coexister entraînant de très hauts niveaux de résistance.

8.3.1 Les β -lactamases :

Depuis leur découverte à la fin des années 1940, chez les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline G, plusieurs centaines d'enzymes ont suivi chez diverses espèces bactériennes pathogènes ou non. Leur classification est basée soit sur leur spectre d'activité enzymatique (classification de Richmond-Sykes ou de K. Bush) soit en fonction de leur séquence en acides aminés (classification d'Ambler).

Ces enzymes hydrolysent le cycle β -lactame, empêchant ainsi les β -lactamines de se fixer de façon covalente (acylation) sur le site actif des enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi, les protéines liant la pénicilline (PLP) (Decré et al., 2000; Phillipon et Arlet, 2006). Des mutations spontanées peuvent conduire à la surexpression ou à l'introduction de changements dans la structure primaire des β -lactamases, ceci peut accroître l'activité de celles-ci vis-à-vis de β -lactamines résistantes à l'hydrolyse enzymatique (Jacoby et Munoz-Price, 2005). Ainsi dans les années 1990 apparaissent les premières souches de BLSE (β -lactamases à spectre étendu) capables d'inactiver des céphalosporines de troisième génération. Les Premières souches productrices de BLSE appartenaient à l'espèce *K.pneumoniae* .

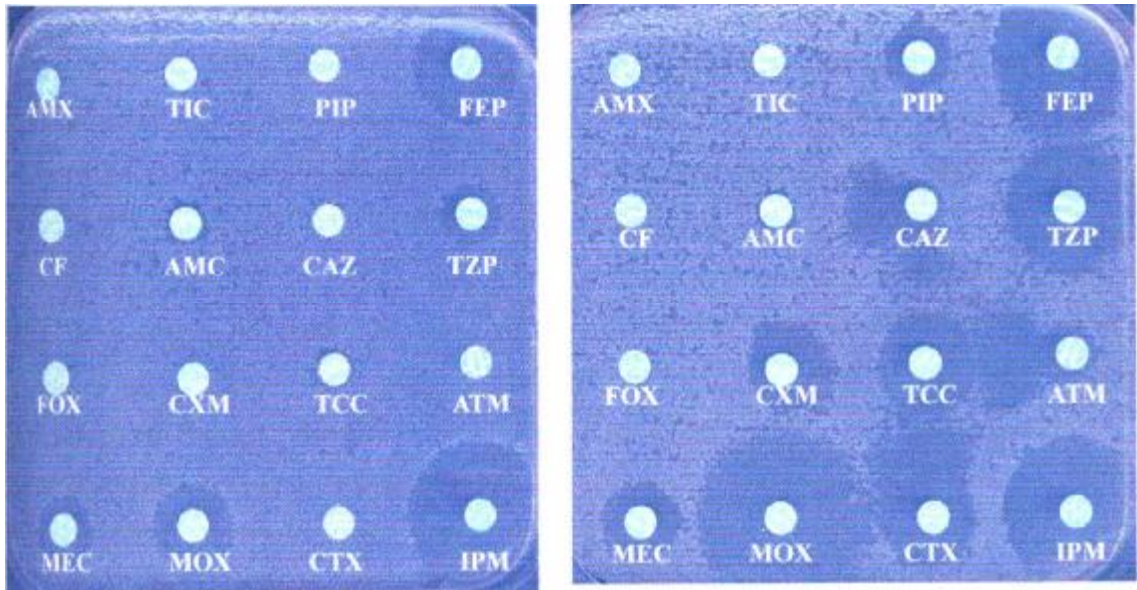
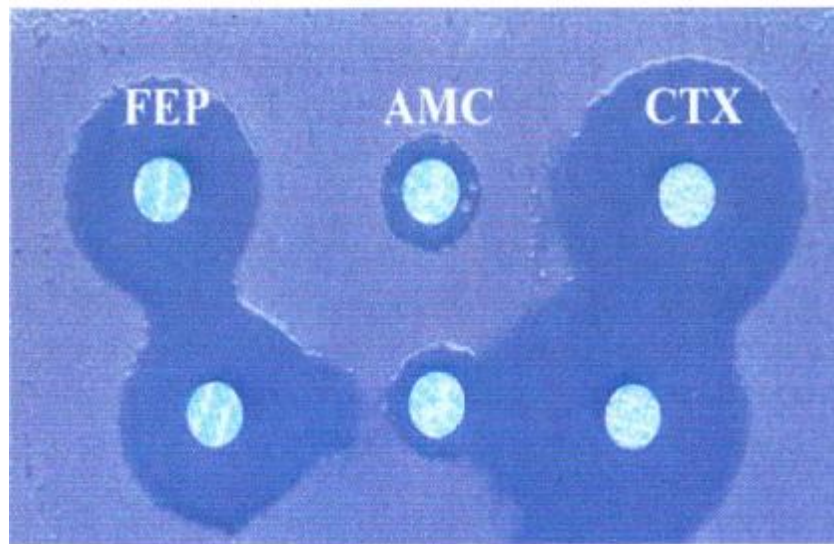
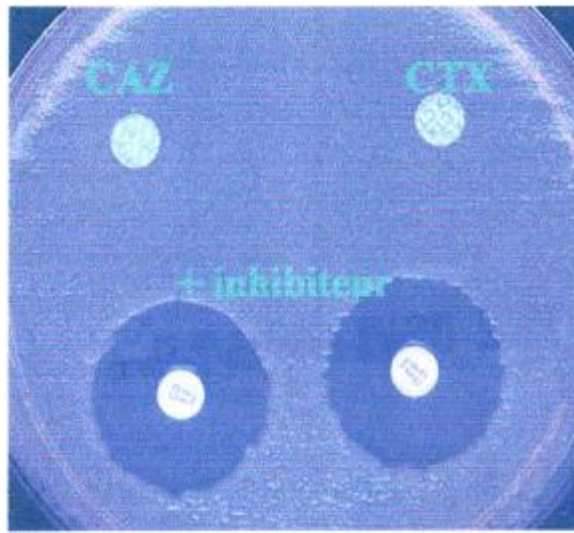


Figure 5 : Détection des BLSE (Bentchouala, 2009)

En l'absence d'image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution de diamètre autour des céphalosporines de troisième génération : pour les Entérobactéries: $CTX \leq 27\text{mm}$, $CAZ \leq 22\text{mm}$, $CRO \leq 25$, $ATM \leq 27$ d'après (standardisation de l'antibiogramme en Médecine humaine à l'échelle nationale, selon les recommandations de l'OMS, 2004). Cependant d'après certains auteurs la synergie entre Cefépime et clavulanate est proposée comme indicateur général de la production des BLSE (Midolo et al., 2002; Andrews, 2003; Potz Nicola et al., 2004)

7.3.1.1. Les facteurs de risque pour la colonisation ou l'infection par les BLSE

Ces facteurs sont surtout :

La présence de cathéter intra vasculaire, chirurgie intra abdominale, instrumentation, gastrotomie, durée du séjour, antibiothérapie et spécialement, assistance respiratoire et admission dans une unité de soins intensifs.

Le processus de la colonisation ou de l'infection par *K.p* BLSE +débute souvent à la suite d'un contact avec les patients colonisés, personnel ou les objets contaminés. L'intestin des patients hospitalisés est le réservoir essentiel ; la transmission est manu portée (Tumbarello et al., 2006).

8.3.1.2. Production de β -lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables

Le nombre des β -lactamases plasmidiques est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les β -lactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tel que l'acide clavulanique (Rahal, 2000; Arlet et Phillipon, 2003). Il existe plusieurs centaines d'enzymes différentes chez les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif, les β -lactamases sont excrétées alors que, chez les bactéries à Gram négatif, toutes les β -lactamases restent localisées à l'espace périplasmique (Bradford, 2001; Gniadkowski, 2001).

Les pénicillinases se divisent en pénicillinases chromosomiques proprement dites et pénicillinases plasmidiques.

Les pénicillinases à large spectre entraînent la résistance à amp-carb-pip et même parfois aux C1G. Elles sont fréquentes chez *K.pneumoniae* (Bonnet, 2006). Les enzymes TRI entraînent la résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases. Elles existent chez *K.pneumoniae*.

Enfin les BLSE entraînant la résistance jusqu'au C3G et les souches restent sensibles à l'imipénème. *K.pneumoniae* est particulièrement intéressée par les BLSE.

Au laboratoire , cette production d'enzymes peut se traduire sur l'antibiogramme classique par l'apparition d'une image de synergie entre le disque chargé d'acide clavulanique (AMC, TCC) et les disques de céphalosporines de troisième génération, image en "bouchon de champagne" .

8.3.1.3. Production de céphalosporinases chromosomiques par des bactéries à Gram négatif

Elles sont actives sur de nombreuses céphalosporines mais aussi sur les pénicillines à large spectre et sur l'aztréonam.

Pour les céphalosporinases elles sont naturellement chromosomiques chez certaines espèces d'entérobactéries, comme *Enterobacter* et *Serratia*, elles entraînent la résistance à amp et C1G, quand elles sont dérégulées, la résistance s'étend aux C3G. On décrit depuis quelques années un transfert plasmidique de ces céphalosporinases chez *K.pneumoniae* la rendant là aussi résistante aux β -lactamines y compris aux C3G (Bush, 2001; Hansen, 2003).

Tableau 5: Phénotypes de résistance aux β -lactamines (Jehl et al., 2003)

Antibiotique	Phénotype sauvage (Pénicillinase Bas Niveau)	Pénicillinase Haut Niveau	BLSE ⁽¹⁾	CHN ⁽²⁾
Aminopénicillines	R	R	R	R
Aminopénicilline + IBL	S	R	R	R
Carboxypénicillines	R	R	R	R
Uréidopénicillines	I	R	R	R
Céphalosporines de 1 ^{ère} génération	S	R	R	R
Céphalosporines de 2 ^{ème} génération	S	I/R	R	R
Céphalosporines de 3 ^{ème} génération	S	S	R	R
Céphalosporines de 3 ^{er} génération+IBL ⁽³⁾	S	S	S	R
Céphamycines	S	S	S	R
Céphalosporines à large spectre ⁽⁴⁾	S	S	R	S
Carbapénèmes	S	S	S	S

(1) β -lactamases à spectre étendu, (2) Céphalosporinase haut niveau plasmidique (très rare),
(3) IBL: inhibiteur de β -lactamase, (4) Céfépime-Céfprome

8.3.2. 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. Le déterminisme génétique est souvent plasmidique (Perichon et al., 2007).

Tous les aminosides possèdent des groupements aminés et des groupements hydroxyles nécessaires à leur activité et ces groupements peuvent être la cible de trois classes d'enzymes (figure 4) :

§ Les acétyltransférases ou AAC catalysent l'acétylation des groupements aminés.

§ Les nucléotidyltransférases ou O-adénylyl (ANT ou AAD) agissent par adénylation des groupements hydroxyles.

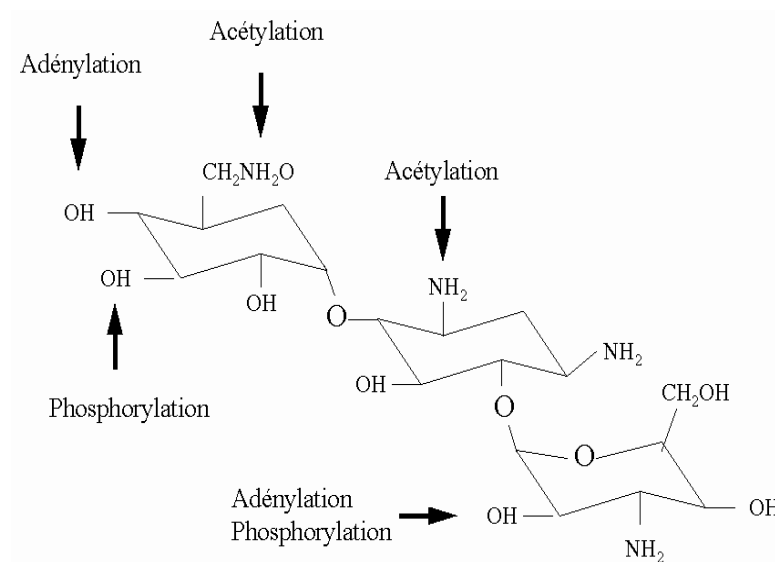
§ Les phosphotransférases ou APH transfèrent un groupement phosphate sur les groupements hydroxyles (Lambert, 2006).

Il convient de noter les points suivants :

§ Un seul aminoside peut être inactivé par plusieurs enzymes.

§ Une seule enzyme peut inactiver plusieurs antibiotiques.

§ Une seule souche peut produire plusieurs enzymes.



Aminosides phosphotransférases APH

- Aminosides adénylltransférases ANT
- Aminosides acétyltransférases AAC

Tableau 6: Phénotypes de résistance acquise des entérobactéries aux aminosides et équipement enzymatique correspondant (Jehl *et al.*, 2003)

Phénotype	Enzymes	Gentamicine	Tobramicine	Netilmicine	Amikacine	Isépamicine	Espèces
G	AAC(3)-I	R	S	S	S	S	<i>E-coli</i> <i>P-mirabilis</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>Enterobacter-cloacae</i>
A	APH(3')VI	S	S	S	R	R	<i>E-cloacae</i>
GT	AAC(3)-VI	R	R	S	S	S	<i>E-coli</i>
TA	ANT(4')-II	S	R	S	R	R	Toutes
GTNt	AAC(2')-I	R	R	R	S	S	<i>P-stuartii</i> <i>E-coli</i>
	AAC(3)-IV	R	R	R	S	S	
KTG	ANT(2'')-I	R	R	S	S	S	Toutes
KTANt	AAC(6')-I	S	R	R	R	S	<i>S-marcesens</i> <i>E-coli</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>E.cloacae</i> <i>E.aeruginosa</i>
KTGNt	AAC(3)-II	R	R	R	S	S	Toutes
KTGANt	Imperméabilité	R	R	R	R	R	Toutes
	Association enzymes	R	R	R	R	R	

8.3.3. Quinolones

Pendant longtemps la résistance aux quinolones était considérée purement chromosomique (Hooper,2000; Ho et al., 2001), mais les études récentes montrent qu'elle peut-être aussi plasmidique (Hooper,2001; Sirot et al., 2002; Galaniet al., 2002).

La résistance plasmidique est décrite pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *K.pneumoniae* hébergeant un plasmide codant pour une protéine Qnr A, protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones (Martinez-Martinez, 1998). Deux autres

mécanismes de résistance plasmidique sont rapportés récemment: inactivation des quinolones par l'acetyltransférase AAC (6')-Ib-cr (Robicsek et al, 2006) et dernièrement, excréation active des fluoroquinolones via la pompe d'efflux QepA (Périchon et al.,2007)

Il n'existe pas de critères phénotypiques sur un antibiogramme permettant de distinguer les mécanismes de résistance chromosomiques et plasmidiques aux quinolones. La détection de ces mécanismes de résistance repose donc sur des techniques de biologie moléculaire (Nordman.P, Mammeri.H, 2007).

Tableau 7: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones (Jehl et al., 2003)

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

8.3.4. Phénicolés

L'inactivation enzymatique est également le mécanisme de résistance le plus fréquent pour le chloramphénicol et le thiamphénicol. Elle consiste en l'acétylation par une chloramphénicol acétyltransférase du groupement hydroxyle de la molécule (Fauchère et Avril, 2002).

9. Origine des gènes de résistance aux antibiotiques

Les gènes de résistance aux antibiotiques pourraient avoir deux origines :

Selon une hypothèse classique, l'origine semble devoir être recherchée chez les microorganismes qui synthétisent naturellement des antibiotiques (de très nombreux antibiotiques, utilisés en thérapeutique, dérivent de ces antibiotiques naturels) et qui doivent se protéger de l'action de ces substances. La synthèse d'antibiotiques par des microorganismes aurait pour fonction d'éliminer d'autres microorganismes, présents dans la

même niche écologique et susceptibles de rivaliser pour l'acquisition de nutriments. Le sol est certainement l'écosystème principal où se déroule cette lutte pour la vie (Wise, 2003; Wise, 2004) :

La plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques sont telluriques. Un plasmide de résistance aux antibiotiques contient souvent des gènes de résistance aux métaux lourds (mercure, plomb, cadmium, bismuth, sels d'argent, ...) qui sont largement présents dans la terre (Brige, 1994).

10. Diffusion de la résistance

La diffusion de la résistance s'effectue soit par la diffusion des gènes de résistance soit par la diffusion des souches bactériennes résistantes.

Les plasmides, les éléments génétiques transposables et les intégrons peuvent diffuser entre bactéries phylogénétiquement éloignées (Singleton, 2005).

La diffusion des souches résistantes se fait par des mécanismes similaires à celui de la diffusion des souches sauvages et elle sera donc fonction de l'espèce bactérienne et de la nature des infections communautaires ou nosocomiales et dans ce dernier cas la transmission se fait par le matériel de soins ou de diagnostic contaminé et essentiellement par les mains sales du personnel soignant. Chez *K.pneumoniae* la transmission est principalement manu portée. Il convient toutefois d'insister sur la transmission à l'homme de bactéries résistantes d'origine animale et réciproquement. Cette transmission conduit, parfois, certains médecins à préconiser l'interdiction des antibiotiques en médecine vétérinaire (Karp et Engberg, 2004). Ce sont les transmissions à l'homme de souches de salmonelles résistantes d'origine animale ou de souches de *Campylobacter jejuni* résistantes aux fluoroquinolones (soit par contact direct soit par ingestion d'aliments mal cuits) qui ont suscité le plus de polémiques (Euzéby, 2009) <http://www.bacteriologie.net/generale/resistance>.

11. Prévention de la résistance aux antibiotiques

Il est important d'intervenir afin de contrer la progression de la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques. La recherche incessante de nouveaux antibiotiques n'est pas la solution. La prévention de la résistance exige des règles plus strictes d'utilisation de certains antibiotiques (Ros, 1999). En Europe, la France représente avec l'Espagne, l'un des pays les plus grands prescripteurs d'antibiotiques à l'hôpital et hors hôpital, on estime actuellement qu'environ la moitié des prescriptions antibiotiques sont inadaptées (Zahar et al., 2003). La prévention repose aussi sur des gestes simples, comme le lavage des mains, le personnel médical est un important vecteur de microorganismes pathogènes potentiellement résistants. La prévention doit aussi se faire auprès du public. Toute fièvre n'est pas infectieuse, toute infection n'est pas bactérienne, toute infection bactérienne ne justifie pas obligatoirement un traitement antibiotique et dans beaucoup de cas, le traitement antibiotique n'est pas une urgence, les antibiotiques ne sont pas le traitement symptomatique et systématique de la fièvre (Argumentaire:Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Produits De Santé, 2002).

Selon un sondage effectué en 2000 dans plusieurs états américains, 32% des personnes interrogées croient que les antibiotiques peuvent guérir un rhume. La résistance est tout particulièrement due à l'usage thérapeutique et prophylactique des antibiotiques dans l'élevage et l'alimentation du bétail puisque les antibiotiques agissent chez l'animal comme facteurs de croissance (Regnault, 2002). Par ailleurs, il existe aussi d'autres alternatives aux antibiotiques actuels.

- Certaines applications médicales des nanotechnologies c'est-à-dire des technologies grâce auxquelles, on peut fabriquer des particules extrêmement petites (nanoparticules), qui pourront délivrer avec précision des médicaments directement dans les tissus ou les cellules que les médicaments classiques ne peuvent pas facilement atteindre.
- L'utilisation de composés photodynamiques, des colorants (porphyrines, phénothiazinium) et des composés fluorescents qui en présence de lumière, se comportent comme des agents phototoxiques dont l'action antibactérienne, antivirale et anticancéreuse a été démontrée récemment.

Materiel et Méthodes

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Cadre de l'étude :

Nous avons choisi de mener ce travail de thèse sur *Klebsiella pneumoniae*, du fait d'une documentation devenue nécessaire chez nous à cause de sa fréquence dans les services et des épidémies causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques.

Les prélèvements sont étudiés au laboratoire de microbiologie du CHU Benbadis de Constantine.

2. Présentation du centre de l'étude :

Le CHU de Constantine est un centre hospitalier régional qui date de l'époque coloniale, avec 1459 lits, une moyenne de 300 000 jours d'hospitalisation par an et d'une capacité importante comportant plus de 1700 actifs, répartis dans les différents services.

3. Matériel

3.1. Souches bactériennes :

Le recueil des souches est réalisé au laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine, les souches proviennent de patients hospitalisés dans les différents services, et de patients qui consultent en externe.

3.1.1. Taille de l'échantillon :

Au total 170 souches ont été isolées dont 12 communautaires et 158 hospitalières. Ces souches ont été étudiées dans un premier temps au laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine, puis dans un deuxième temps, 52 souches ont fait l'objet d'une étude approfondie en biologie moléculaire au laboratoire de bactériologie à l'institut Pasteur de Strasbourg en France (Pr Monteil H), et enfin 15

souches parmi les 52 ayant servi à la biologie moléculaire, sont caractérisées au laboratoire de bactériologie et de virologie de l'hôpital Bicêtre à Paris (Pr Naas Th).

3.1.2. Distribution des souches ayant servi à la biologie moléculaire

Souches hospitalières	Souches externes
44	8
Total 52	

3.1.3. Durée de l'étude :

La collecte des souches s'est étendue sur environ 18 mois (De septembre 2002 à juin 2004) avec une fréquence d'isolement de 28.23% en 2002, de 24.71% en 2003, et de 47.06% en 2004.

Année	Nombre de souches	Pourcentage %
2002	48	28.23
2003	42	24.71
2004	80	47.06
Total	170	100

Il n'y a pas de différence significative dans l'isolement des souches par année, vu que l'isolement a été discontinu.

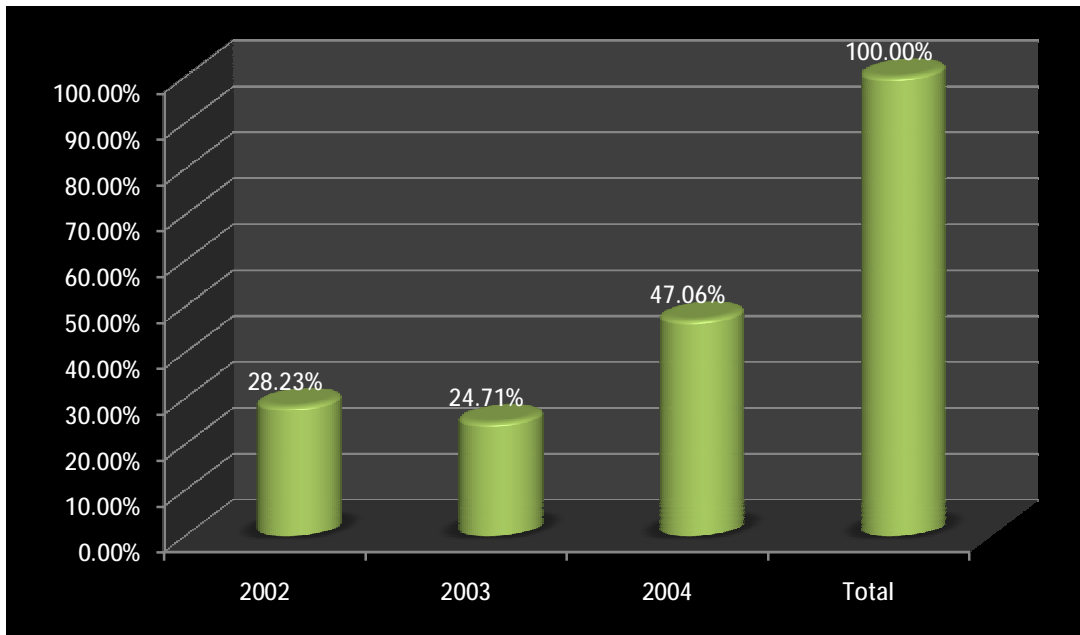


Fig 5: Répartition des souches par année d'étude

3.1.4. Prélèvements :

Tous les prélèvements sont réalisés à des fins diagnostiques. Pour chaque site, la nature de l'examen réalisé est indiquée entre parenthèses. Les sites sont les suivants :

- Le sang (hémoculture).
- L'urine (examen cyto bactériologique des urines).
- Le site << pus profond et séreuses >> (examen bactériologique des liquides des séreuses infectées).
- Le site <<cathéter vasculaire>> (analyse bactériologique après ablation d'un cathéter).
- Le site<<sonde urinaire>> (analyse bactériologique après ablation de la sonde).
- Le site broncho-pulmonaire (examen cyto bactériologique des sécrétions broncho-pulmonaires).
- Le site <<drain>> (analyse bactériologique après ablation du drain).
- Le site<<sonde d'intubation>> (analyse bactériologique après ablation de la sonde).
- Le site cutané superficiel (écouvillonnage des plaies et des pus superficiels).
- Autres sites : site ORL (écouvillonnage), site uro-génital (examen des sécrétions et exsudats urogénitaux).

4. Méthodes d'étude :

En pratique, il faut combiner 3 méthodes pour une discrimination optimale des souches bactériennes entre elles. Pour obtenir une information épidémiologique de qualité, l'identification bactérienne est systématiquement accompagnée d'un antibiogramme, ces deux méthodes phénotypiques sont ensuite complétées par une recherche approfondie de biologie moléculaire des souches isolées (électrophorèse en champ pulsé dans notre étude).

4.1. Identification bactérienne (étude systématique):

Après la coloration de Gram et ensemencement sur milieux gélosés (Hektoen) ou numération sur milieu de gélose nutritive (pour les urines), les souches sont identifiées selon les méthodes classiques en usage au laboratoire, à savoir, par les galeries biochimiques API 20E (analytical profile index) (Richard, 1994, Sirot et al., 2002)

Cette technique consiste à réaliser 20 tests avec la galerie, puis interpréter les résultats à l'aide de la base de données API 20E (Bio-Mérieux)

La galerie se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'enzymes ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui réhydrate les substrats. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par un changement spontané ou révélé par l'addition de réactifs. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.



Figure 6: galerie API20 E identifiant *K.pneumoniae*

4.2. Etude de la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques.

(Antibiogramme).

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique ou le traitement sera un échec. Le résultat numérique brut est accompagné d'une interprétation ou remplacé par elle: résistant, sensible, intermédiaire, ou (indéterminée) (Scavizzi et al., 2000).

- Pour chaque souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée un antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton contrôlé par le fabricant pour sa teneur en Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ et thymidine (IPA). (Disques Sanofi-diagnostics.Pasteur), selon la technique de l'écouvillonnage, recommandée par le CLSI.

4.2.1. Technique

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (inoculum à 0,5 Mac Farland de turbidité).
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube pour le décharger.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Recharger l'écouvillon pour chaque boîte de Pétri.
- Application des disques d'antibiotiques: elle se fait à l'aide de distributeurs automatiques. Certains disques sont déposés manuellement avec une pince stérile, utiles pour un rapprochement ou éloignement des disques, ou pour un choix positionnel comme l'emplacement des inhibiteurs.
- Incubation : les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.
- Dans notre travail la souche de référence étudiée est:
- *E.coli* ATCC 25922 souche sensible (Americain Type Collection Culture), utilisée pour contrôler les paramètres de conformité (conformité des résultats).

Au total 25 antibiotiques ont été testés. Parmi les β -lactamines : Amoxicilline (AMX), l'association Amoxicilline acide clavulanique (AMC), ticarcilline (TIC), Ticarcilline+ac-

clavulanique (TCC), pipéracilline (PIP), pipéracilline+tazobactam (TZP), céfazoline (CFZ), cefoxitine (FOX), ceftriaxone (CRO), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefépime (CFP), aztreonam (ATM), cefotetan (CTT), imipénème (IPM) et comme quinolones : Ac-nalidixique (Nal), Pefloxacine (PEF), et Ciprofloxacine (CIP).

Parmi les aminosides : gentamicine (G), tobramicine (T), amikacine (A) netilmicine (Nt), kanamicine (K), et iséamicine (IS). Et comme sulfamide: le Cotrimoxazole, l'association triméthoprimé sulfaméthaxazole (SXT).

feuille d'interprétation d'antibiogramme standard au laboratoire

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE CONSTANTINEDR BENBADIS

SERVICE DE MICROBIOLOGIE

N°

PRISMATIF

ANTIBIOGRAMME : ENTEROBACTERIES

Nom Prénom : Age

nature du prélèvement : Service :

diagnostique bactériologique :

AMOXICILINE			KANAMYCINE		
AMOXICILINE+AC- CLAVULANIQUE			TOBRAMYCINE		
TICARCILLINE			GENTAMYCINE		
PIPERACILLINE			AMIKACINE		
CEFAZOLINE			ACIDE NALIDIXIQUE		
CEFOXITINE			PEFLOXACINE		
CEFOTAXIME			CIPROFLOXACINE		
CEFTAZIDIME			SULFAMETHOXAZOLE+		
			TRIMETHOPRIME		
CEFEPIME			COLISTINE		
AZTREONAM			CHLORAMPHENICOL		
MIPENEME			FOSFOMYCINE		
TETRACYCLINE			FURADOINE		
MINOCYCLINE					

S: sensible, R: résistant, I: Intermédiaire

Date de réponse :

Opérateur

4.2.2. Lecture et interprétation:

Les résultats sont exprimés en mm après lecture des diamètres des zones d'inhibition et sont interprétés en trois catégories: S= sensible, R= résistant, et I= intermédiaire, en se référant aux normes CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

4.3. Phénotypes de résistance aux β -lactamines : Les phénotypes courants sont:

4.3.1. Pénicillines de bas niveau (PBN) :

Conférant une résistance aux aminopénicillines (l'amoxicilline), aux ureïdopénicillines (la piperacilline) et aux carboxypénicillines (la ticarcilline), ce phénotype se caractérise par la persistance d'un diamètre d'inhibition autour des disques d'aminopénicillines, contrairement au phénotype pénicilline haut niveau caractérisé par l'absence de diamètre d'inhibition autour de ces disques.

4.3.2. Pénicillines de haut niveau (PHN) :

Touche l'AMC, les céphalosporines de première génération (C1G) et peut s'étendre aux C2G (céfamandole).

4.3.3. Phénotype TRI (TEM résistant aux inhibiteurs) :

Il s'agit d'une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et à moindre niveau aux ureïdopénicillines, se distinguant du phénotype PHN par une résistance aux associations des aminopénicillines et des carboxypénicillines avec les β -lactamines inhibitrices, alors que les C1G sont préservées.

4.3.4. β -lactamases à spectre étendu (BLSE) :

Enzymes à médiation plasmidique, conférant une résistance à toutes les β -lactamines et n'épargnent que les C2G de type céphamycine comme la FOX, ainsi que l'imipénème.

4.3.4.1. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi :

La détection de la résistance aux C3G est une étape essentielle dans la décision thérapeutique et la surveillance épidémiologique. La BLSE est soupçonnée devant toute diminution du diamètre de la zone d'inhibition d'une C3G.

4.3.4.1.1. Test de synergie

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamases et un disque C3G (ceftriaxone, ceftazidime, et cefotaxime) ou un monobactam (aztréonam). L'image de synergie dite en bouchon de champagne est caractéristique de la présence de BLSE. (Voir figure).

Selon la technique du (CLSI) de l'antibiogramme, un inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18h. La gélose Mueller-Hinton estensemencée selon la méthode préconisée par (CLSI), puis deux disques, l'un contenant l'association amoxicilline-acide clavulanique et l'autre une cephalosporine de troisième génération, sont placés côte à côte à 3cm de distance mesurés centre à centre. Les boîtes de Pétri sont incubées 18h à 37°C.

L'image de synergie peut-être en bouchon de champagne caractéristique de la BLSE, ou bien en entonnoir correspondant souvent à une hyperproduction de β -lactamases naturelles, la production d'une β -lactamase de type penicillinase rend les souches de *K.p* résistantes aux pénicillines. Si cette β -lactamase est d'une part sensible à l'acide clavulanique et d'autre part capable d'être hyper-produite, la possibilité d'un <<faux positif>> est possible, chez le <<faux positif>> la souche étudiée ne possède pas cette enzyme, cela évoque une production élevée de β -lactamase chromosomique intrinsèque. Chez le <<faux négatif>> l'image de synergie est absente, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution de diamètre autour des cephalosporines de troisième génération ou des monobactames :

CTX \leq 27mm; CAZ \leq 22mm; CRO \leq 25mm; ATM \leq 27mm.

<<Le faux négatif>> s'observe chez les souches qui possèdent deux mécanismes de résistance aux β -lactamines, une BLSE et une hyperproduction naturelle, la synergie recherchée est masquée par le deuxième mécanisme de résistance. La mauvaise expression de β -lactamase (synergie faible) peut-être responsable de <<faux positif>>.

La lecture du test de synergie s'avère souvent délicate pour cela des tests complémentaires doivent être pratiqués.

4.3.4.1.2. Tests complémentaires

- Test du double disque (test espagnol)

La détection de la β -lactamase à spectre élargi (étendu) peut être confirmée par le test du double disque. Ce test plus sensible consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G.

La technique est la suivante :

A partir d'une culture de 18h une suspension est préparée avec une opacité égale à 0.5 Mc Farland, une gélose Mueller-Hinton estensemencée selon la technique de l'antibiogramme. Deux disques sont déposés, un disque AMC et un disque de C3G (CTX ou CAZ). On laisse diffuser à température ambiante pendant une heure, puis le disque AMC est ôté et remplacé par un disque de C3G (CTX ou CAZ). Les boîtes sont incubées 18h à 37°C.

Le test est considéré positif, si le diamètre de la zone d'inhibition du disque de C3G est inférieur de 4 à 5 mm, comparé à celui observé autour du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC.

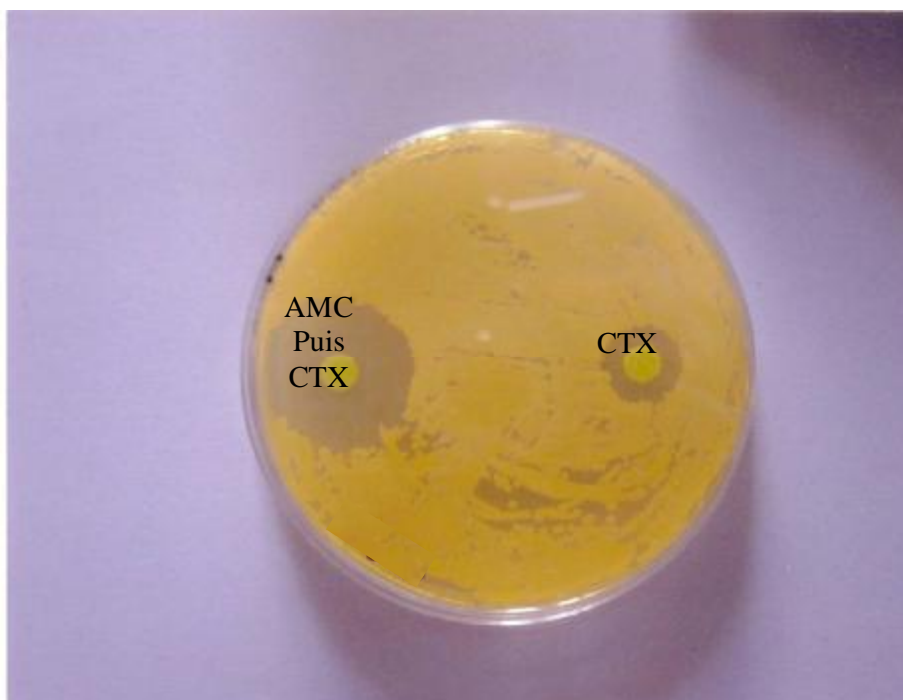


Figure 7: Test du double disque (test espagnol) pour la détection des BLSE

- **Test du rapprochement des disques**

Lorsqu'un second mécanisme de résistance est susceptible de masquer la présence de l'image de synergie, il est possible de retrouver cette dernière en rapprochant les disques de C3G ou de l'aztreonam (15 à 20) du disque de l'AMC. La préparation de l'inoculum et l'ensemencement se font de la même manière que le test de synergie, le disque AMC est placé au milieu de la boîte de Pétri (Rahal, 2003).

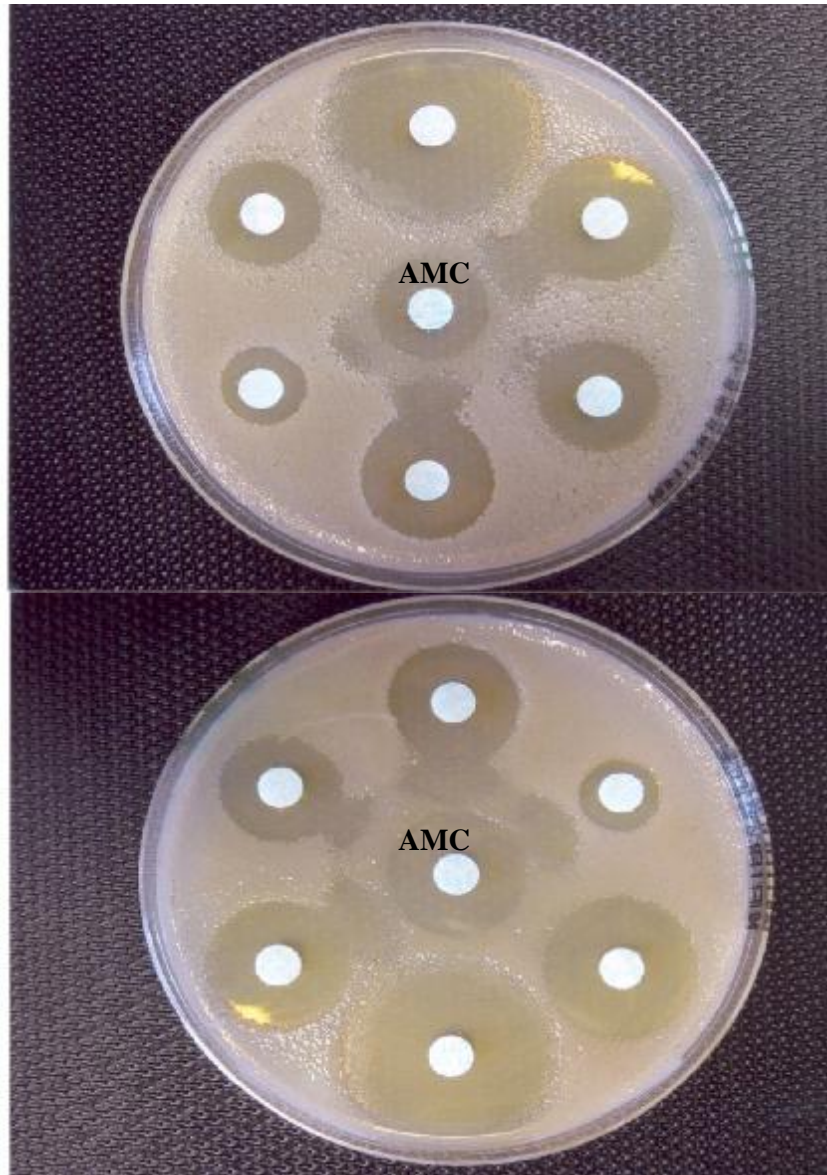


Figure 8: Images de synergie entre AMC et β -lactamines (CAZ, CTX, ATM, CRO, CFP, IPM)

- Test à la cloxacilline

Principe:

Le test cloxacilline est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase déréprimée.

La cloxacilline ajoutée au milieu pour antibiogramme Mueller-Hinton inhibe très fortement toutes les céphalosporinases de la classe A d'Amber. (Stürenburg et al, 2004; Farah et al., 2006). Si un tel mécanisme de résistance est présent on constate en comparant les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton à la cloxacilline une restauration de l'activité des β -lactamases et apparition de l'image de synergie en bouchon de champagne recherchée.

Méthode:

La concentration de cloxacilline est de 0,25 mg/ml, il faut dissoudre 25 mg de cloxacilline dans 10ml d'eau distillée. Mettre 2 ml de cette concentration avec 18 ml du milieu Mueller-Hinton.

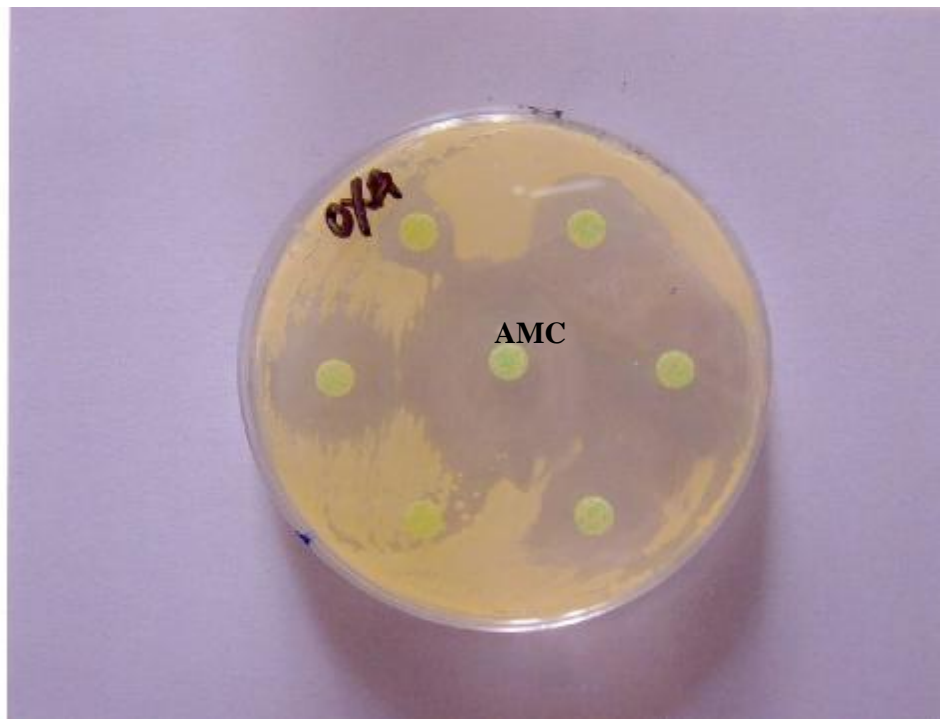


Figure 9: Test à la cloxacilline

4.3.5. Détermination du phénotype de résistance des BLSE

La détermination des phénotypes de la BLSE se fait par la détection des substrats préférentiels de cette enzyme, elle se réalise en recherchant les éventuelles images de synergie en bouchon de champagne qui peut apparaître, sur gélose, entre les disques de bêta-lactamines utilisés.

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme. Les disques d'antibiotiques suivants : AMC, CAZ, CTX, CRO et ATM sont placés sur la gélose Mueller-Hinton selon le schéma ci-dessous. La distance entre deux disques est de 3 cm. L'incubation des boîtes se fait 18 à 24h à 37°C.

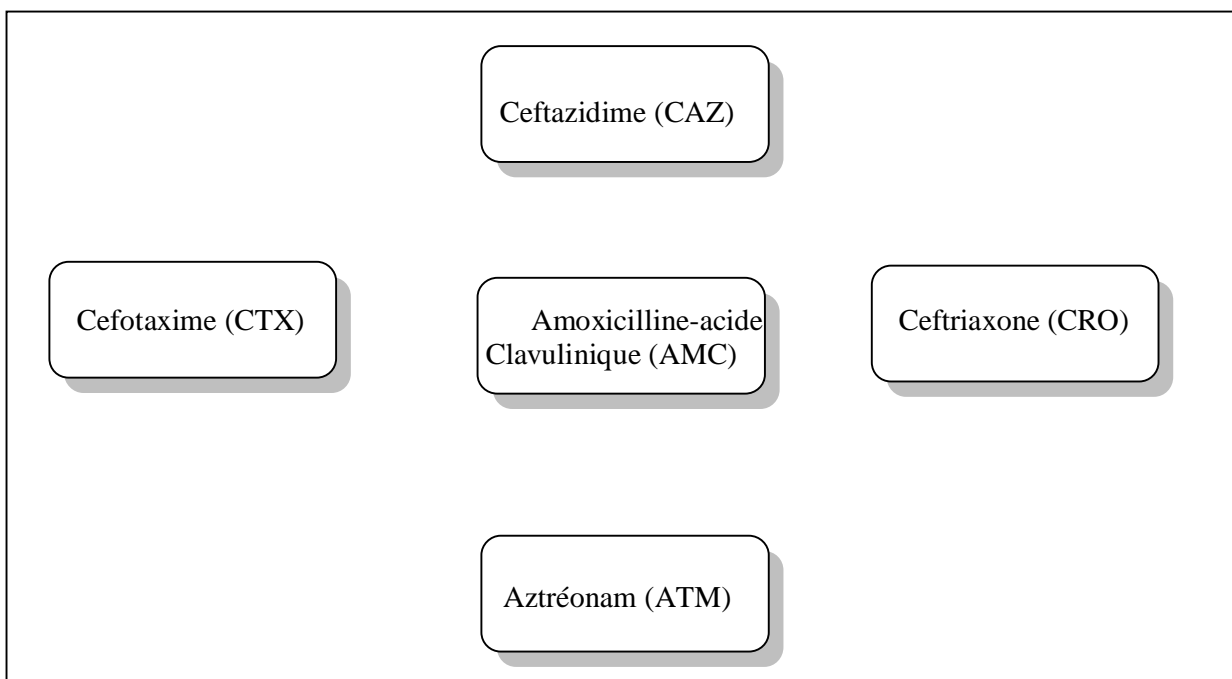


Figure 10 : Schéma explicatif de la détermination des phénotypes de résistance de BLSE

4.3.6. Les phénotypes rares :

Sont la céphalosporinase plasmidique (aminopénicillines, AMC, et C1G résistants), céphalosporinase de haut niveau (AMC, cefoxitine et C3G résistants) voire phénotype résistant à l'imipénème.

4.3.7. Phénotypes de résistance aux aminosides:

Ils sont étudiés par (G), (T), (Nt), (K), et (A) par différence dans les zones d'inhibition impliquant des enzymes modificatrices, et c'est le cas de la plupart des résistances observées. En absence de coexistence de plusieurs mécanismes de résistance, on peut soupçonner une diminution de perméabilité par une diminution du diamètre pour tous les aminosides, ou une résistance de haut niveau avec zones fantomes due au gène arm A souvent lié aux BLSE et due à une méthylation de l'ARN 16S (résistance de très haut niveau aux 5 antibiotiques).

4.3.8. Phénotypes de résistance aux quinolones :

Ils sont déterminés par l'ac-nalidixique (NAL), l'ofloxacin (OFX), la norfloxacin (NOR), et la ciprofloxacine (CIP). Dans notre étude nous avons testé l'acide nalidixique, quinolone de première génération comme marqueur de résistance. Nous avons testé les fluoroquinolones suivantes: la pefloxacin et la ciprofloxacine. Nous décrivons le phénotype sauvage et les phénotypes de résistance à l'ac-nalidixique soit isolée par mutation sur gyr A soit associée à une résistance à la pefloxacin ou à la ciprofloxacine par addition de mutation avec plus ou moins de problèmes d'imperméabilité.

4.4. Techniques de la biologie moléculaire :

4.4.1. Electrophorèse en champ pulsé :

En plus des deux techniques phénotypiques précédemment décrites, nous avons utilisé une méthode de biologie moléculaire qui s'avère beaucoup plus discriminante, en l'occurrence l'électrophorèse en champ pulsé.

L'électrophorèse en champ pulsé est réalisée en utilisant le Kit Gene Path Group 5 Reagent Kit (Biorad Diagnostic, Ivry-sur-Seine, France).

Immobilisation des bactéries

La suspension bactérienne est centrifugée à 11000g pendant 2 minutes, afin d'obtenir un culot de taille bien définie. Celui-ci est remis en suspension dans la solution tampon fournie par le Kit puis mélangé à 100 µl d'agarose en surfusion (50°C). Ce mélange est immédiatement inséré dans un moule à <<plugs>> et la procédure est résumée dans la *figure* 11. Cette étape permet d'immobiliser les bactéries dans un bloc d'agarose qui constituera une protection mécanique pour la suite de la procédure.

Lyse des enveloppes cellulaires

Les plugs sont immergés dans un tampon de lyse contenant du lysozyme pendant une heure à 37°C sous agitation douce. Dans le bloc, la paroi bactérienne est dirigée par le lysozyme. L'ADN bactérien est ensuite libéré par la protéinase K après incubation à 37°C pendant 18 heures. Après 3 rinçages d'environ 45 minutes qui visent à éliminer la protéinase K et à adapter les conditions physico-chimiques du milieu à l'étape de digestion enzymatique suivante.

Insertion des plugs

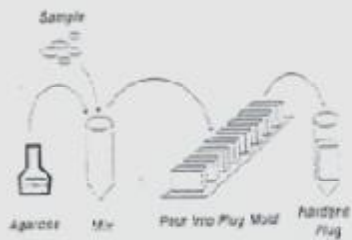
L'ADN bactérien est coupé en des sites de restriction spécifiques avec l'enzyme *SpiI* fournie par le Kit. Les plugs sont incubés à 50°C avec cette enzyme, pendant 48 heures. Après digestion, les plugs sont insérés dans les puits d'un gel d'agarose de migration.

Séparation des fragments d'ADN par ECP

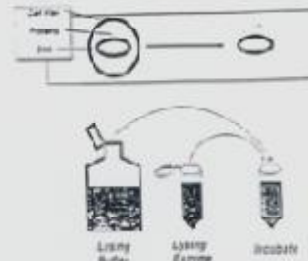
La migration électrophorétique en champ pulsé réalisée en utilisant le programme <<Eco2>> préenregistré dans le module de commande de l'appareillage Biorad, dure

16 heures avec une température maintenue à 14°C. La révélation des profils d'ADN (pulsotypes) se fait après coloration par le bromure d'éthidium (5 gouttes de BET additionné à 200 ml d'eau : recommandation du Kit). Le gel est rincé deux fois 20 minutes à l'eau distillée. Les bandes d'ADN sont visualisées sur un transilluminateur UV et une photographie de chaque gel est finalement réalisée (Prevost et al., 1993; Barouton et al., 1995; Stewart et Lessing, 1999 D'Agata et al., 2001)

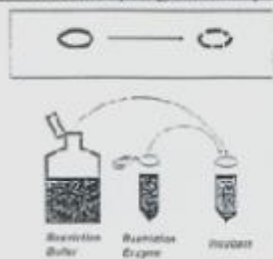
1. Immobilisation des bactéries dans des blocs d'agarose



2. Lyse des enveloppes cellulaires



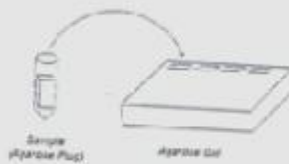
3. Création de fragments d'ADN



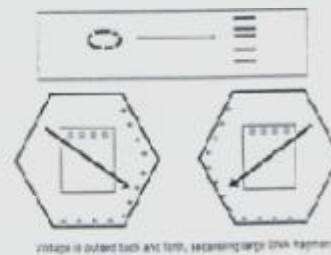
4. Déprotéinisation



5. Insertion des plugs dans le gel d'agarose



6. Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en champ pulsé



7. Les pulsotypes générés pour chaque souche

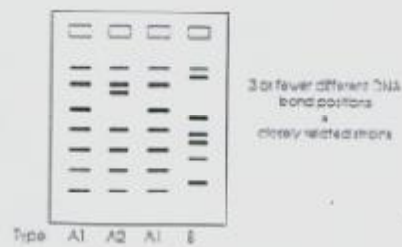


Figure 11 : Les différentes étapes de réalisation des plugs (Biorad Diagnostic)

4.4.2. Typage des BLSE:

Les CMI ont été réalisées sur un automate VITECK 2, utilisant les cartes antibiogramme à bacilles à Gram négatif AST N°17 (bioMérieux nancy l'Etoile, France) à partir d'une suspension à 0.5 Mac Farland. Cette technique a concerné 15 souches *K.p* BLSE+ parmi les 52 souches qui ont servi à la biologie moléculaire, dans le but de faire le typage de ces BLSE.

Les antibiotiques utilisés sont: Amoxicilline, amoxicilline-ac.clavulanique, ticarcilline, ticarcilline-ac.clavulanique, tazopipéracilline, cefazoline, ceftaxime, ceftazidime et imipénème. La caractérisation génétique a été ensuite réalisée par PCR en collaboration avec le laboratoire de bactériologie et de virologie à l'hôpital Bicêtre à Paris (Professeur Th.Naas).

4.5. Exploitation des données :

Dans un premier temps, une analyse factorielle discriminante (AFD) a été utilisée pour les 52 souches ayant servi à la biologie moléculaire. Cette analyse a concerné l'étude des variables (les antibiotiques testés) et l'étude des individus (les 52 souches) ceci en calculant l'indice de corrélation et la distance de Mahalanobis afin de savoir si les groupes sont rapprochés ou éloignés.

En plus de l'AFD un test du χ^2 a été utilisé pour la recherche du degré d'association entre la présence ou non des souches bactériennes et les variables : Le sexe, le site de l'infection et le service d'hospitalisation. Le seuil de significativité est fixé à $P < 0,005$.

Résultats

Résultats

1. Souches bactériennes isolées :

De novembre 2002 à juin 2004, 170 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été recueillies.

158 hospitalières et 12 externes.

1.1. Répartition des souches selon l'origine du prélèvement :

Les résultats illustrés ci-dessous montrent une prédominance des souches hospitalières par rapport aux souches communautaires. Conformément aux données de la littérature, l'espèce *K.p* est plus fréquemment isolée à l'hôpital qu'en communauté, 85% contre 15% (decré et al., 2000).

Tableau 8 : Répartition des souches selon l'origine du prélèvement

Origine	Effectif	Pourcentage
Souches hospitalières	158	92.94
Souches communautaires	12	7.05
Total	170	100

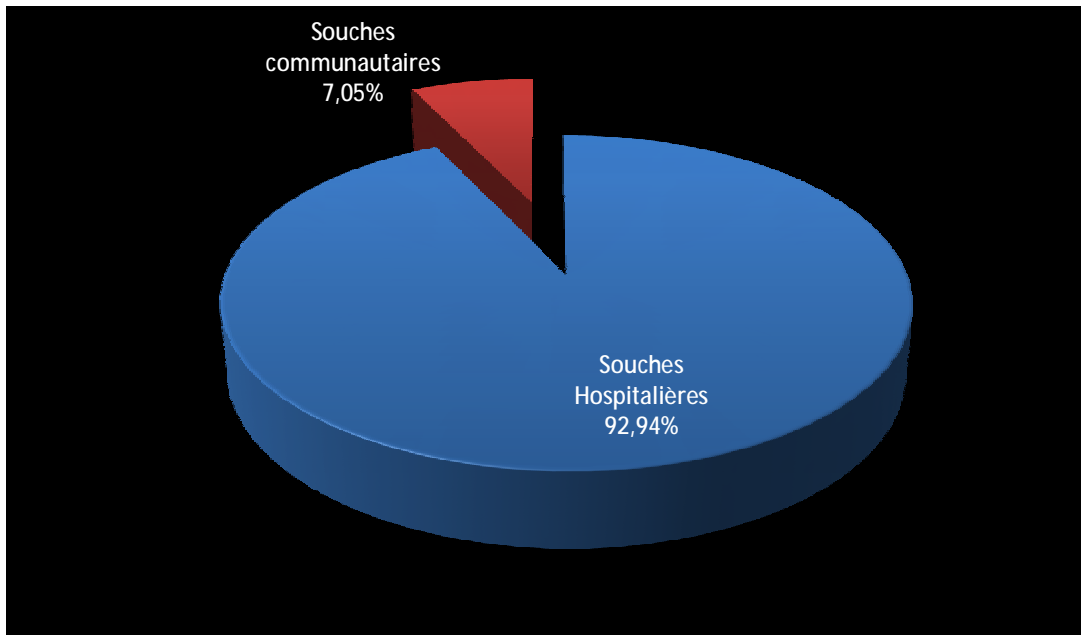


Figure 12 : Répartition des souches selon l'origine du prélèvement

1.2. Distribution des souches parmi les prélèvements cliniques :

Sur les 170 souches isolées, 46.47% proviennent de la bactériologie générale (qui regroupe les prélèvements de pus et sérosités purulentes, prélèvements respiratoires, cathéters, drains, sondes urinaires et trachéal), 30% d'hémocultures et 23.53% d'urines. Dans notre étude le nombre de prélèvements urinaires est le plus faible. Contrairement aux rapports de la littérature, où les prélèvements urinaires sont toujours dominants.

Tableau 9: Répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques n= 170

Prélèvement	N. de <i>K.p</i> isolée	Pourcentage (%)
Pus et sérosité	79	46.47
Hémoculture	51	30
Urines	40	23.53
Total	170	100

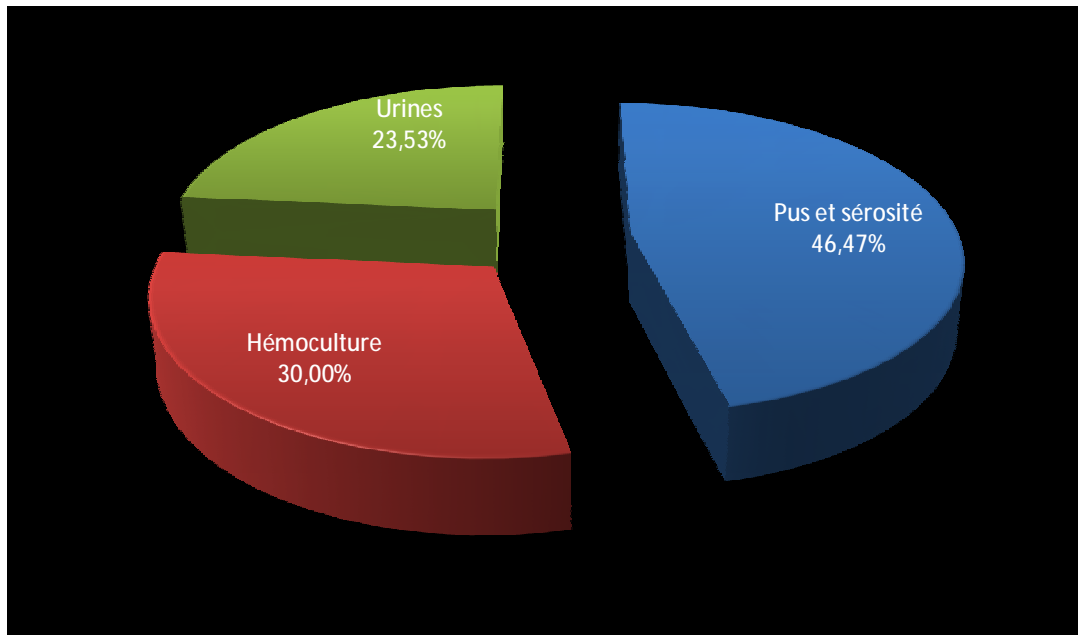


Figure 13 : Répartition de *Klebsiella pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques

1.3. Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine parmi les prélèvements effectués en 2004

Parmi tous les prélèvements effectués en 2004, *K.p* enregistre une fréquence de 2.08%

Tableau 10 : Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine parmi les prélèvements effectués en 2004.

Années	Nombre de prélèvements	Effectif	
		N	%
2004	21600	450	2.08

1.4. Répartition des souches de *K.p* en fonction des prélèvements positifs

La distribution des résultats positifs pour l'année 2004, toutes les souches confondues, révèle une

Distribution de 12.74% pour *K.p*.

Tableau 11 : Répartition des souches de *K.p* en fonction des prélèvements positifs

Années	Nombre de prélèvements positifs	Effectif	
		N	%
2004	3531	450	12.74

1.5. Répartition des souches selon l'origine et le service d'hospitalisation

La répartition des souches selon leur provenance montre que 92.94% des souches sont isolées des différents services de l'hôpital, (souches hospitalières), contre 7.05% isolées de l'extérieur (souches communautaires). Le service de réanimation enregistre le taux le plus important de souches de *K.p* avec une fréquence de 40,58%, suivi des services médecine avec une fréquence de 21,76%, en revanche la plus basse distribution est enregistrée au service de néonatalogie (12.35%).

Tableau 12 : Répartition des souches par service d'hospitalisation

Service	Effectif	Pourcentage %
Réanimation	69	40,58
Chirurgie	31	18,23
Néonatal	21	12,35
Médecine	37	21,76
Externes	12	7.05
Total	170	100

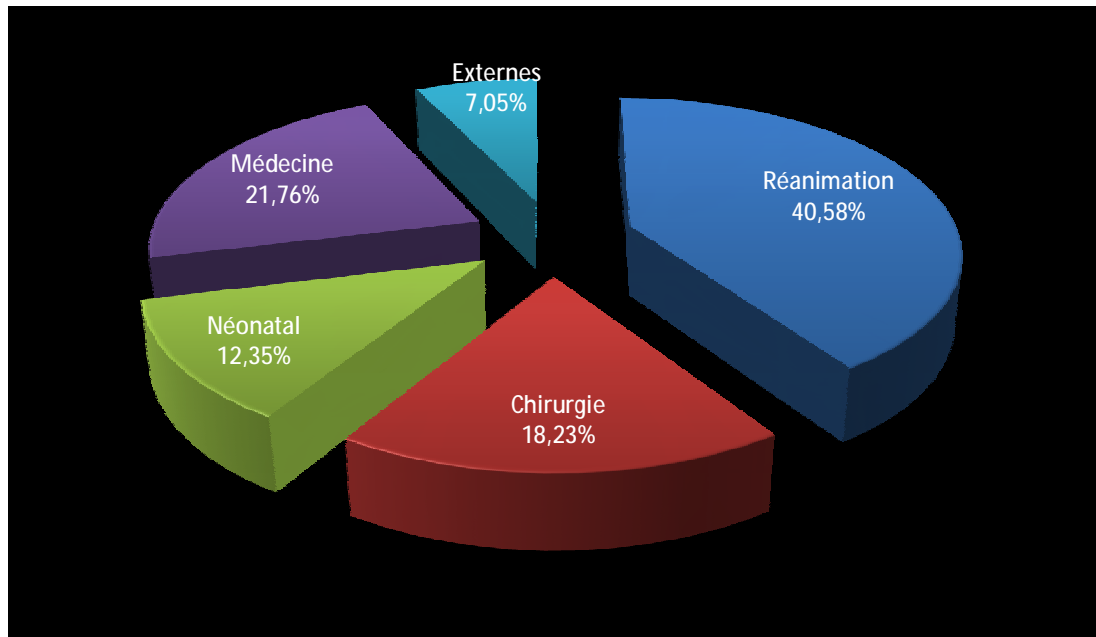


Figure 14 : Répartition des souches par service d'hospitalisation.

1.6. Distribution globale selon le sexe

Parmi les 170 souches isolées, 78 (45,88%) proviennent de femmes et 92(54,11%) d'hommes. Le sexe ratio est de 1,17. On peut remarquer que les souches de *K.p* se répartissent presque à part égale pour les deux sexes. Ce critère physiologique ne semble pas influencer les infections nosocomiales. Selon le sexe la fréquence d'isolement est statistiquement non significative. Par contre celui de l'âge et qui est en rapport avec le statut immunitaire des patients, aurait son influence, c'est en effet un des facteurs de risque pour l'infection par *K.p* ; puisque les plus touchés sont les personnes âgées et les immunodéprimées, ainsi que les nourrissons, conformément à de nombreux rapports.

Sexe	Effectif	Pourcentage %
Homme	92	54,11%
Femme	78	45,88%
Total	170	100%

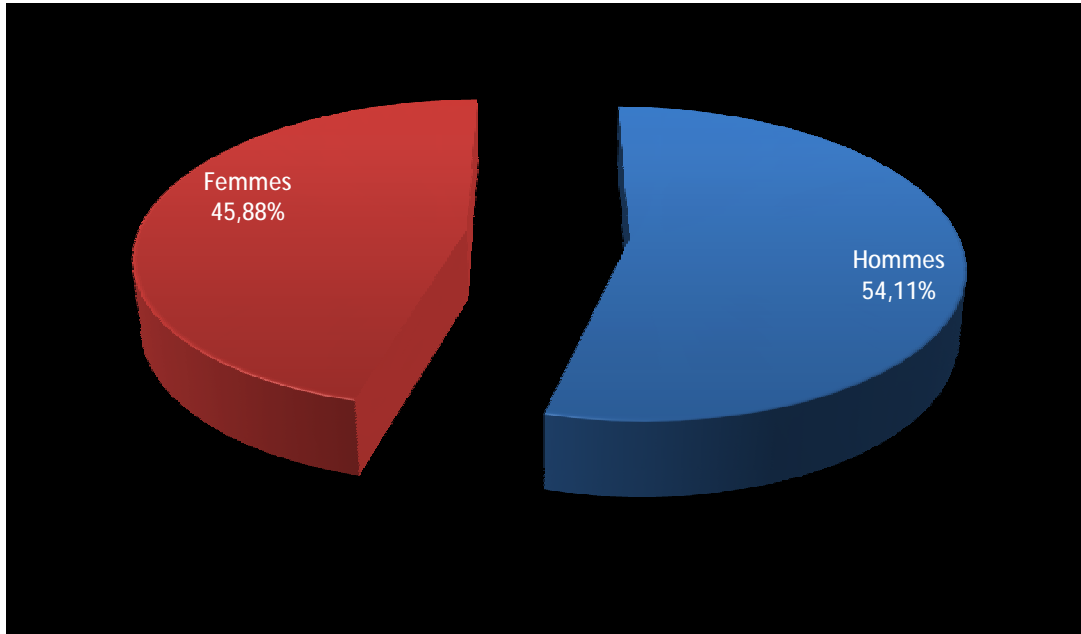


Figure 15 : Distribution globale selon le sexe

1.6.1. Sexe ratio par service

Par service, la réanimation est la plus représentée avec 69 patients dont 38 hommes et 31 femmes. Le service de médecine avec 37 patients, répartis en 20 femmes et 17 hommes. Pour la chirurgie qui compte 31 cas, on note 17 femmes et 14 hommes. La néonatalogie compte 12 filles et 9 garçons. Les traitements ambulatoires, au nombre de 12, comptabilisent 7 hommes et 5 femmes.

Tableau 13: Sexe ratio par service

Service	Homme	Femme
Reanimation	38	31
Chirurgie	14	17
Médecine	17	20
Néonatalogie	9	12

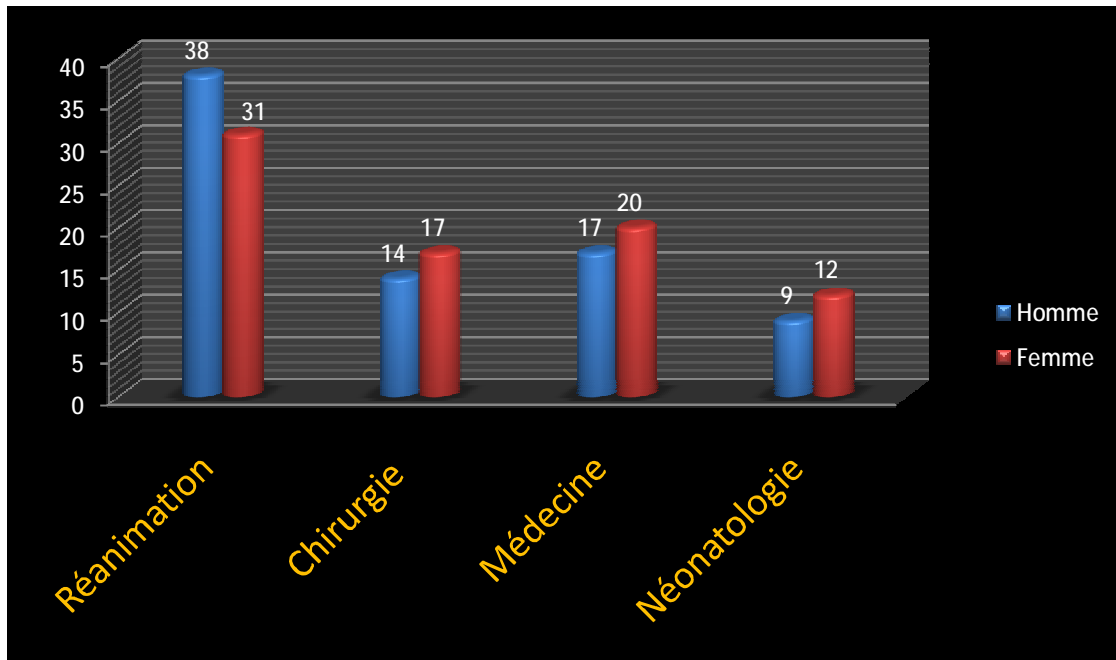


Fig 16: Sexe ratio par service

2. Etude analytique en API 20^E :

2.1. Fréquence des profils numériques en API 20^E (par ordre numérique)

Sur les 170 souches de *K.p* isolées des différents services et traitements ambulatoires, 5 profils numériques différents sont enregistrés parmi lesquels, le profil 52 15 773 est le prédominant, on le retrouve dans 133cas, sa fréquence est de 78.23%, suivi du profil numérique

52 05 773 pour (uréase-) dans 13 cas, avec une fréquence de 7.64%, et du profil 52 14 773 pour (VP-) qu'on retrouve dans 10 cas avec une fréquence de 5.88%. Le profil 52 15 573 pour (inositol-) retrouvé dans 9 cas et enfin le profil 5205573 pour (urée-, inositol-) avec une fréquence de 2.94%, retrouvé dans 5cas.

Tableau 14 : Fréquence des profils en API 20^E des 170 souches de *K.p* par ordre numérique

API 20 ^E Profile	Nombre	(%) des souches
52 15 773	133	78.23
52 05 773	13	7.64
52 14 773	10	5.88
52 15 573	9	5.29

52 05 573	5	2.94
-----------	---	------

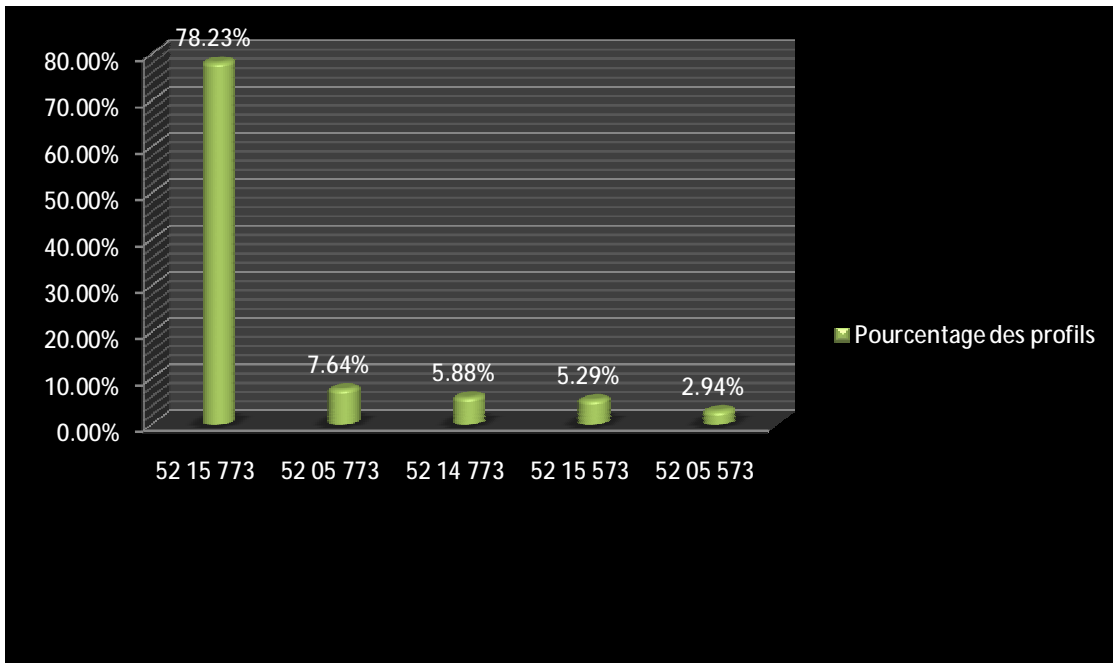


Figure 17 : Fréquence des profils en API 20^E des 170 souches de *K.p* par ordre numérique

Tableau 15 : Le 52 15 773

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5			2			1			5			7			7			3	

Tableau 16 : Le 52 05 773

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5			2			0			5			7			7			3	

Tableau 17 : Le 52 05 573

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5			2			0			5			5			7			3	

Tableau 18 : Le 52 14 773

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5			2			1			4			7			7			3	

Tableau 19 : Le 52 15 573

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5			2			1			5			5			7			3	

2.2. Traduction des profils numériques de *Klebsiella pneumoniae*, en Caractères biochimiques

Tableau 20: Traduction des profils numériques de *Klebsiella pneumoniae*, en Caractères biochimiques

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
5215773	+	•	+	•	+	•	+	•	•	+	•	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5205773	+	•	+	•	+	•	•	•	•	+	•	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5205573	+	•	+	•	•	•	•	•	•	+	•	+	+	•	+	+	+	+	+	+
5215573	+	•	+	•	+	•	+	•	•	+	•	+	+	•	+	+	+	+	+	+
5214573	+	•	+	•	+	•	+	•	•	•	•	+	+	•	+	+	+	+	+	+

2.3. Relation profils numériques en API 20^E et site d'infection

Le profil numérique 52 15 773 de *Klebsiella pneumoniae* est le plus fréquent dans la majorité des prélèvements, il varie de 0% à 75% pour les autres prélèvements. Il est prédominant dans les prélèvements de pus (75%), ensuite dans les prélèvements des urines et d'hémoculture. Ce profil est suivi du profil 52 05 773 avec 40% de souches isolées des urines.

Tableau 21 : Relation site d'infection et profils en API 20^E

Type de prélèvement	Profil le plus fréquent 52 15 773	Autres profils
Pus et sérosité = 79	59 (75%)	20
Hémoculture = 51	29 (54%)	22
Urines = 40	26 (60%)	14
Total =170	114	56

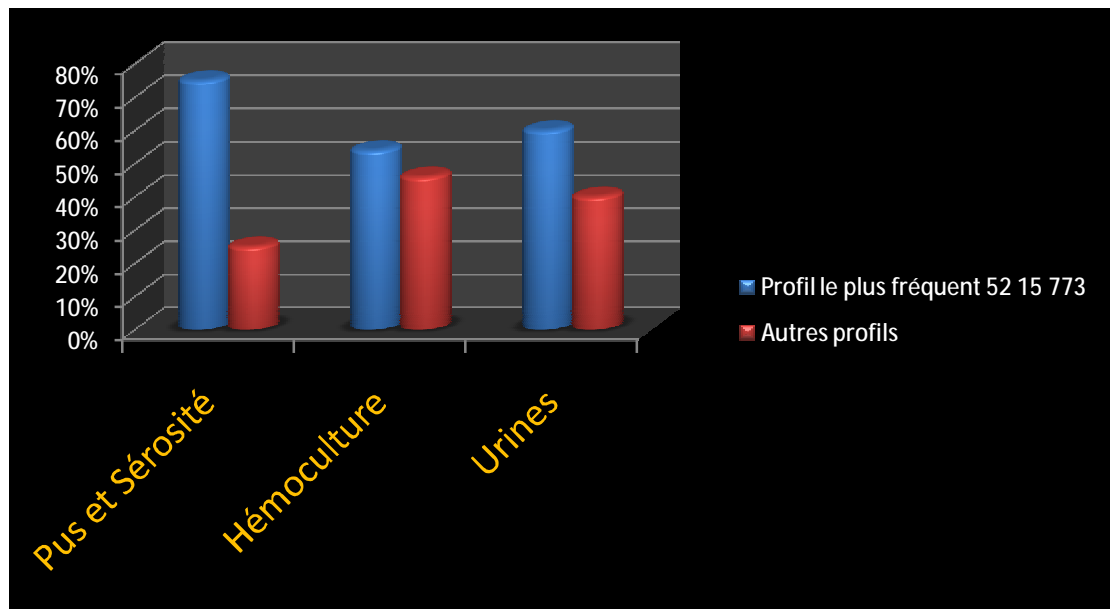


Figure 18: Relation site d'infection et profils en API 20^E

2.4. Répartition des profils numériques par service d'hospitalisation

La relation profil numérique et origine de la souche, nous informe encore une fois, que le phénotype 52 15 773 est prédominant dans tous les services et que sa fréquence varie entre 75% et 83,78%. Ainsi les services de médecine enregistrent le taux le plus élevé, 83,78%, suivis du service de néonatalogie avec 80,95% et de la chirurgie avec 80,64%.

Tableau 22 : Externes

Profil API 20 ^E	Effectifs	Fréquence %
52 15 773	9	75%
52 14 773	3	25%
Total	12	100%

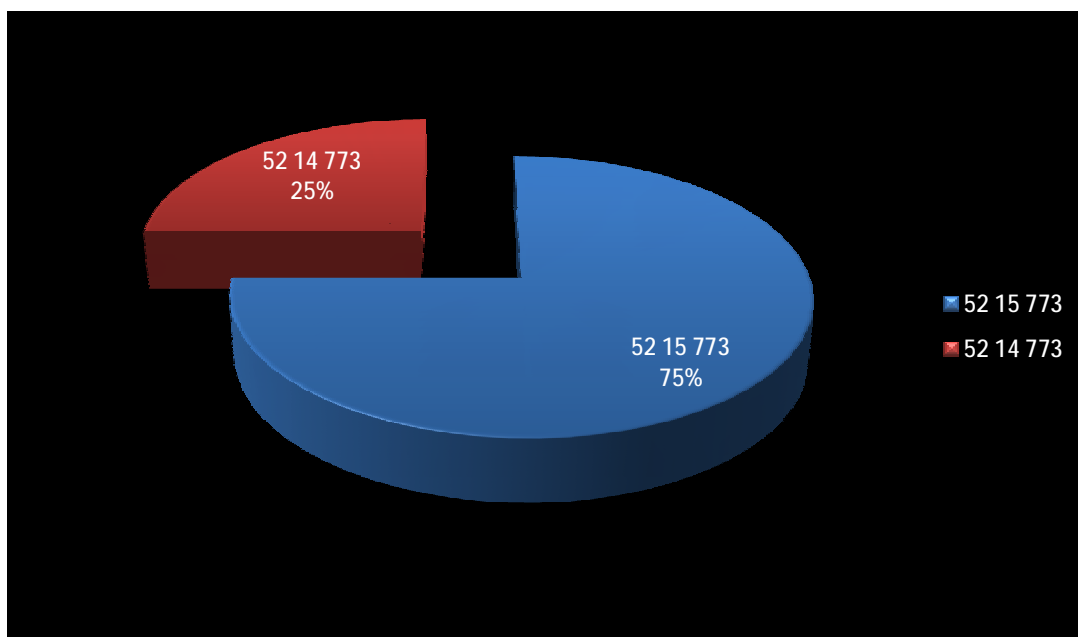


Figure 19 : Répartition des profils numériques chez les externes

Tableau 23: Réanimation

Profil API 20 ^E	Effectifs	Fréquence %
52 15 773	51	73,91
52 05 773	8	11,59
52 05 573	2	2,89
52 15 573	4	5,79
52 14 773	4	5,79
Total	69	100

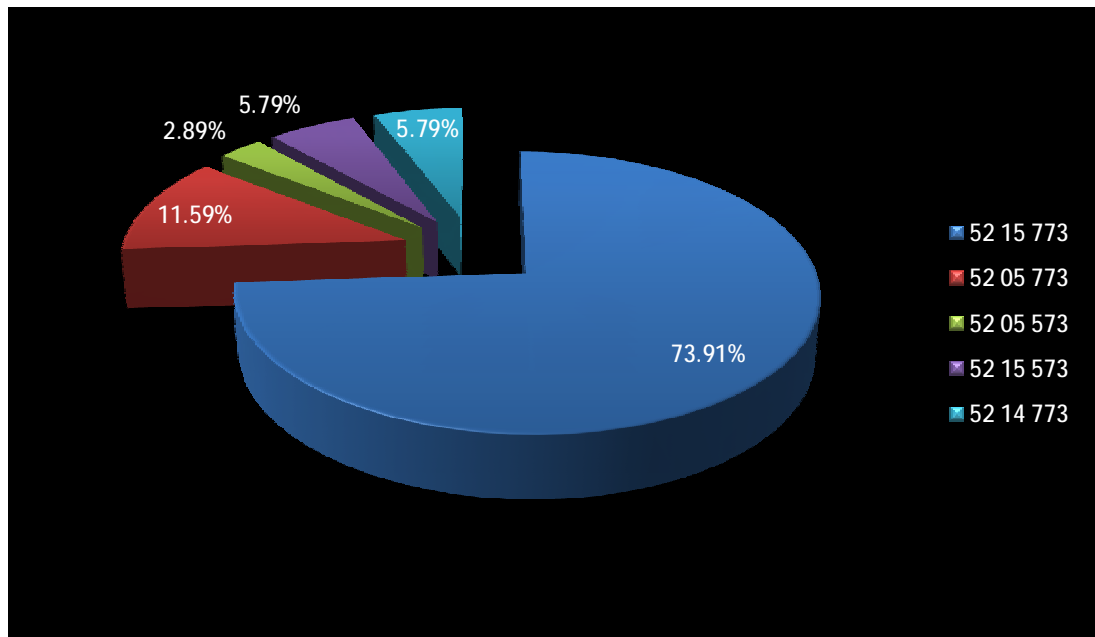


Figure 20 : Répartition des profils numériques dans le service de réanimation.

Tableau 24 : Chirurgie

Profil API 20 ^E	Effectifs	Fréquence %
52 15 773	25	80,64
52 05 773	2	6,45
52 15 573	1	3,22
52 05 573	1	3,22
52 14 773	2	6,45
Total	31	100

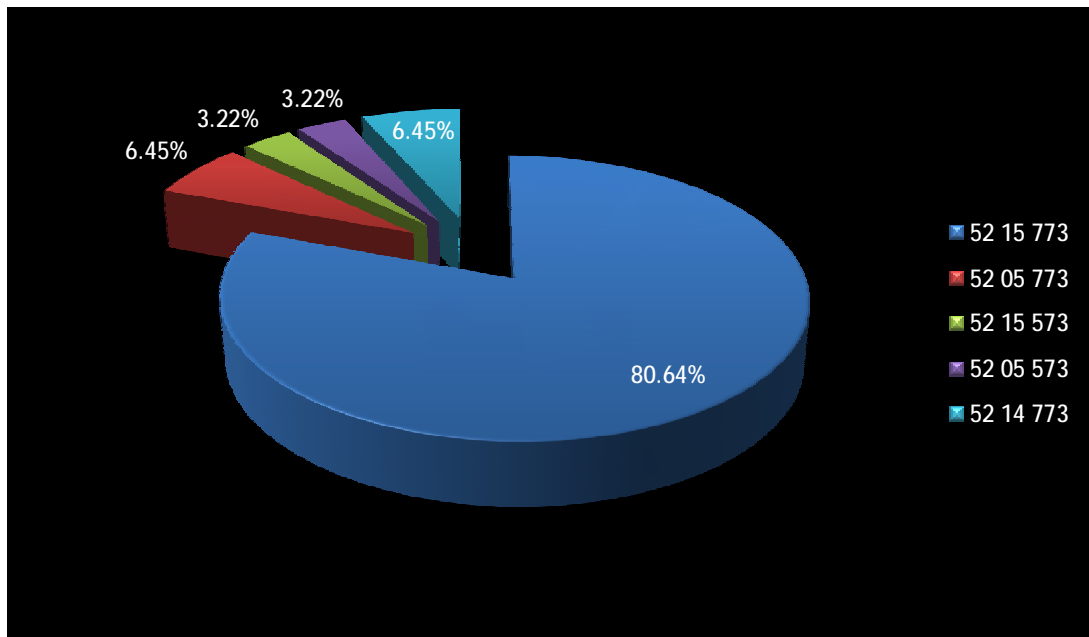


Figure 21: Répartition des profils numériques dans le service de chirurgie

Tableau 25 : Médecine

Profil API 20 ^E	Effectifs	Fréquence %
52 15 773	31	83,78
52 05 773	3	8,10
52 05 573	1	2,70
52 15 573	2	5,40
Total	37	100

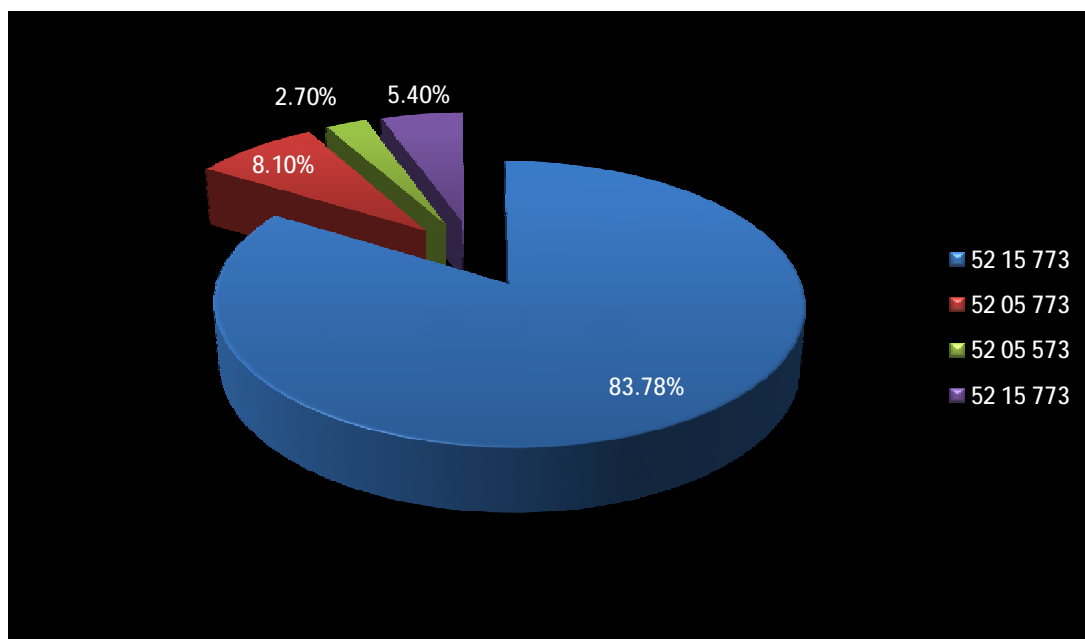


Figure 22: Répartition des profils numériques dans le service de médecine

Tableau 26: Néonatalogie

Profil	Effectif	Fréquence %
52 15 773	17	80,95
52 15 573	2	9,52
52 05 573	1	4,76
52 14 773	1	4,76
Total	21	100

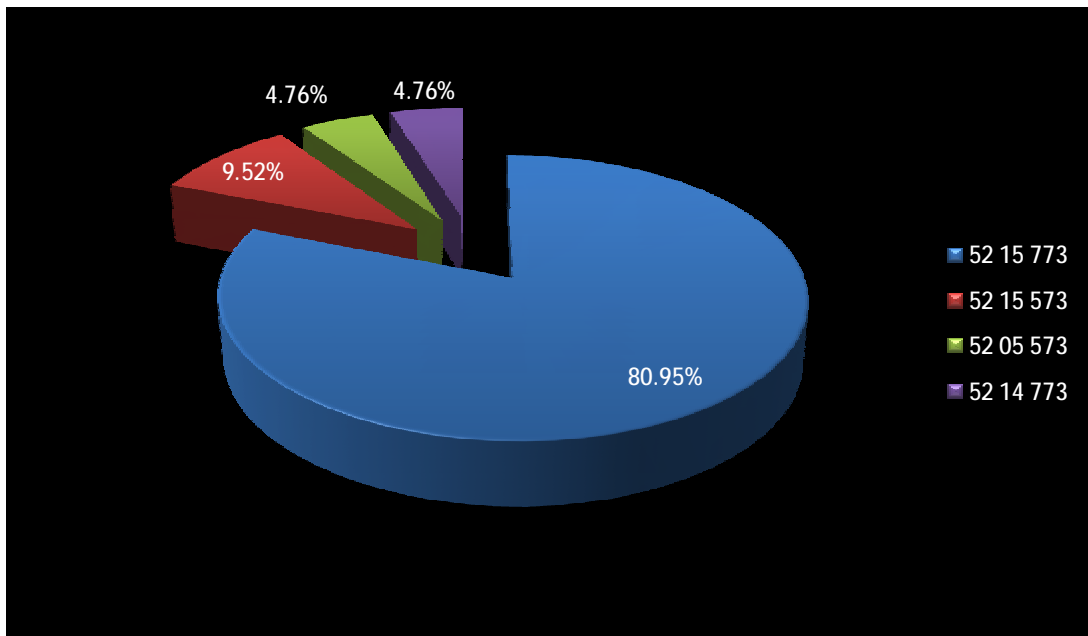


Figure 23 : répartition des profils numériques en pédiatrie-néonatalogie

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*

3.1. Profil de sensibilité globale de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques.

K.pneumoniae présente une résistance naturelle (chromosomique) à l'ampicilline et aux carbénicillines, et peut acquérir des résistances multiples. 43,35% des souches résistent à l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC), 59,61% à l'association ticarcilline-acide clavulanique (TCC), 81% à la pipéracilline, mais l'addition du tazobactam diminue ce taux à 9,61%. Le taux de résistance acquise à la céfazoline s'élève à 73,07% et il est de 61,76% pour le céfotaxime. En revanche les souches restent à 100% sensibles aux cefamycines (FOX et CTT) et à l'imipènème. Concernant les aminosides, on assiste à une résistance assez marquée pour la gentamicine et la tobramicine 69.23% et 65.38% respectivement. Cette importante résistance concerne aussi la netilmicine et la kanamicine avec 60.75%, et 65.82%. L'isépamycine et l'amikacine manifestent le même taux de résistance ,48.07%. Une excellente activité est enregistrée pour les fluoroquinolones qui marquent 0% de souches résistantes aussi bien pour l'ofloxacin que pour la ciprofloxacine avec des diamètres d'inhibition très importants. Cependant un taux de résistance important est noté pour l'acide nalidixique qui passe à 28.84%, ce qui pourrait refléter l'usage commun de cet antibiotique et ce fait signale l'existence d'un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones. Pour les sulfamides et triméthoprime 65.38% de souches résistent à l'association triméthoprime + sulfaméthazole.

Tableau 27: Profil de sensibilité globale de *K.pneumoniae* aux antibiotiques n= 170

Antibiotiques	Breck-points	%R	%I	%S
Amx/Amp	15-18	100	0	0
Amx+ac.clav	15-20	43.35	37,6	19.05
Ticarcilline	19-21	96.35	3,64	0
Tic+ac-clav	19-21	59.61	9.61	30,76
Pipéracilline	13-19	81	6	13
Pip/tazobactam	15-20	9.61	23	67,38
Imipénème	18-21	0	2,94	97,06
Céfazoline	13-17	73.07	3.84	23.07
Céfoxitine	16-21	0	0	100
Céfotaxime	16-20	61.76	7.69	30.55
Ceftazidime	16-20	41.15	12,35	46,5
Céfotétan	16-24	0	0	100
Aztréonam	18-22	62	00	38
Cefépime	14-18	34	33	33
Tobramycine	15	65.38	1.92	32.69
Amikacine	16	48.07	3.86	48.07
Gentamicine	15	69.23	0	30.76
Netilmicine	14-18	60.75	5.06	34.17
Kanamicine	14-18	65.82	3.79	30.37
Isépamycine	15-17	48.07	0	51.92
Triméthoprime-Sulfaméthaxazole	11-15	65.38	0	34.61
Ac-nalidixique	16-19	28.84	5.78	65.38
Pefloxacine	17-21	0	0	100
Ciprofloxacine	20-21	0	0	100

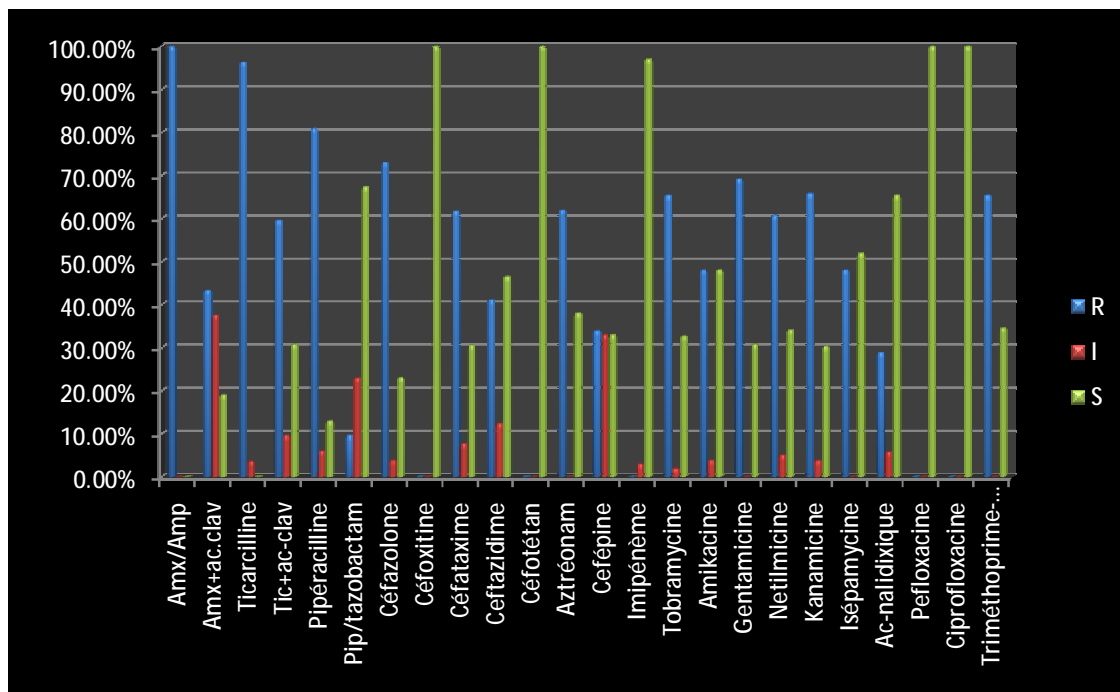


Figure 24- Profil de sensibilité globale de *K.pneumoniae* aux antibiotiques.

3.2. Variations chez les malades externes

Les souches de *K.p* isolées de malades consultant en externe, résistent dans 25% des cas à l'association amoxicilline-ac .clavulanique et à la pipéracilline. Les *Klebsiella* résistent dans 0,69% des cas à l'association pipéracilline-tazobactam. La résistance à la ticarcilline est de 92.35%, l'acide clavulanique rétablit la sensibilité à 75% avec l'association ticarcilline+acide clavulanique. Concernant les aminosides, l'amikacine reste la molécule la plus active avec 0% de résistance, la tobramicine et la gentamicine enregistrent le même pourcentage de résistance et de sensibilité à savoir 25% de souches résistantes et 75% de souches sensibles. Pour les quinolones 12.5% des souches sont résistantes à l'ac-nalidixique. En revanche les fluoroquinolones conservent leur excellente activité vis-à-vis des souches externes avec le taux de 0% de résistance pour les trois molécules testées.

Tableau 28: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades externes. n=12

Antibiotique	Break-Point	%R	%I	%S
Amx-ac.clav	15-20	25	0.69	62.5
Ticarcilline	19-21	95	0	5
Tic+ac clav	19-21	25	0	75
Pipéracilline	13-19	25	0.69	62.5
Pip+tazobactam	15-20	0.69	37.5	50
Imipénème	18-21	0	0	100
Cefotaxime	16-20	0	0	100
Cefépime	14-18	12.5	0	87.5
Amikacine	16	0	12.5	87.5
Gentamicine	15	25	0	75
Isépamycine	15-17	25	0	75
Ac-nalidixique	16-19	12.5	0	87.5
Ofloxacine	17-21	0	0	100
Ciprofloxacine	20-21	0	0	100
Triméthoprim- Sufaméthaxazole	11-15	25	0	75

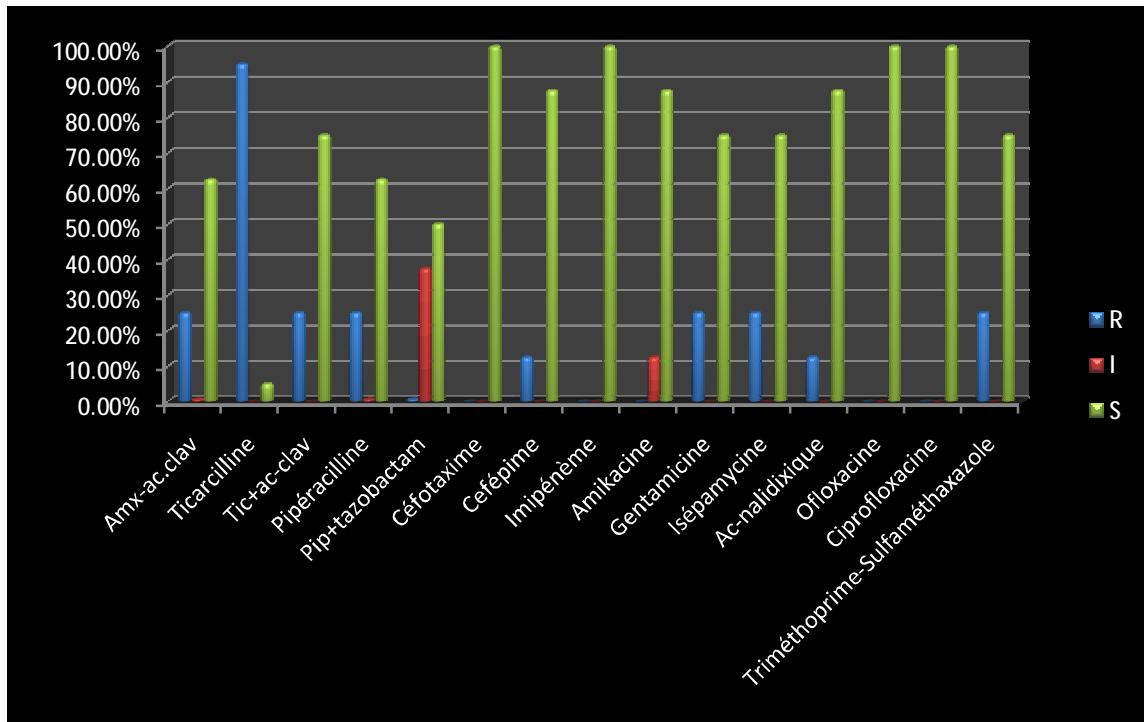


Figure 25: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades externes.

3.3. Profil de résistance des souches de *K.p* chez les malades hospitalisés

Pour les β -lactamines, le taux de résistance est très élevé, en moyenne 80%, en dehors des antibiotiques associés aux inhibiteurs, et la cefoxitine et l'imipénème qui restent très actifs.

Pour les aminosides, la résistance à la gentamicine monte à 77% et celle de l'amikacine à plus de 56%. Nous relevons 32% pour l'acide nalidixique. Par contre, les fluoroquinolones conservent une excellente activité, avec 0% de résistance à la ciprofloxacine et à l'ofloxacine.

Tableau 29: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades hospitalisés. n= 158

Antibiotiques	Breack-points	%R	%I	%S
Amx/Amp	15-18	100	0	0
Amx+ac.clav	15-20	43,18	45,45	11,36
Ticarcilline	19-21	95,45	4,45	0
Tic+ac-clav	19-21	65,90	11,36	22,72
Pipéracilline	13-19	84,09	4,54	11,36
Pip/tazobactam	15-20	9,09	22,72	63,63
Imipénème	18-21	0	3,16	96,84
Céfazoline	13-17	81,81	4,54	13,63
Céfoxitine	16-21	0	0	100
Céfotaxime	16-20	68,18	6,81	25
Ceftazidime	16-20	22,72	47,72	29,54
Céfotétan	16-24	0	0	100
Aztréonam	18-22	40,90	34,09	27,27
Cefépime	14-18	38,63	34,09	27,27
Tobramycine	15	72,72	2,27	25
Amikacine	16	56,81	2,27	40,90
Gentamicine	15	77,27	0	22,72
Netilmicine	14-18	68,18	18,18	13,63
Kanamicine	14-18	72,27	3	24,72
Iséпамycine	15-17	54,45	0	45,45
Triméthoprim- Sulfaméthaxazole	11-15	72,72	0	27,27
Ac-nalidixique	16-19	31,81	2,27	61,36
Pefloxacine	17-21	0	0	100
Ciprofloxacine	20-21	0	0	100

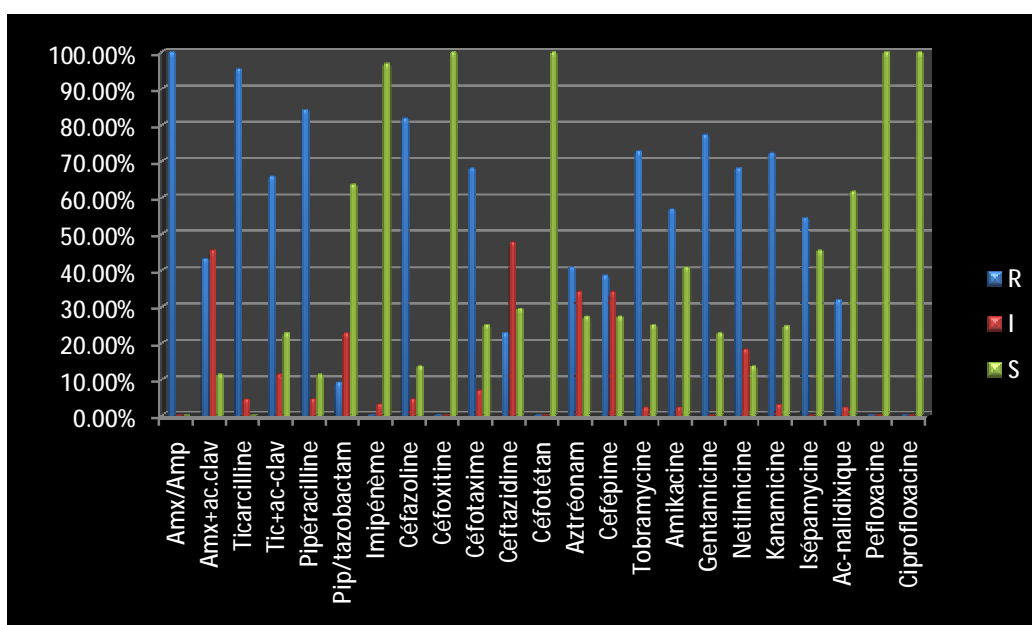


Figure 26: Fréquence du profil de sensibilité aux antibiotiques chez les malades hospitalisés

3.4. Variations inter services du profil de sensibilité de *K. pneumoniae* aux antibiotiques

3.4.1. Variations dans les services de soins intensifs

Les soins intensifs regroupent le service de réanimation, de médecine interne et de neurochirurgie. Le profil de sensibilité varie d'un service à un autre. Les services de réanimation sont les plus grands pourvoyeurs de bactéries multi résistantes. Une forte diminution de sensibilité des *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis des C3G est notée avec 59.72% au céfotaxime. Idem pour les aminosides où 75% de souches résistent à la gentamicine, et 69.44% de souches résistent à l'amikacine, un antibiotique présumé très actif. L'isépamycine malgré sa nouveauté enregistre 69.72% de souches résistantes.

Les souches résistent dans 50% des cas aux quinolones de première génération, contre 0% aux fluoroquinolones.

Tableau 30 : Profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de réanimation. N=72

Antibiotique	Break points	%R	%I	%S
Amoxicilline+ Ac-clav	15-20	40.27	50	9.72
Ticarcilline	19-21	90.27	9.72	0
Tic+ac .clav	19-21	59.72	9.72	30.55
Pipéracilline	13-19	80.55	9.72	9.72
Pip-tazobacam	15-20	0	59.72	40.27
Imipénème	18-21	0	4,16	95,83
Céfotaxime	16-20	60.72	0	40.27
Céfépime	14-18	40	30	30
Céfotétan	16-24	0	0	100
Amikacine	15-17	69.44	0	30.55
Gentamicine	14-16	75	0	25
Isépamycine	15-17	69.72	0	30,28
Ac- nalidixique	17-20	50	0	50
Pefloxacine	16-22	0	0	100
Ciprofloxacine	20-21	0	0	100
Triméthoprime sulfaméthaxazole	11-15	69.44	0	30.55

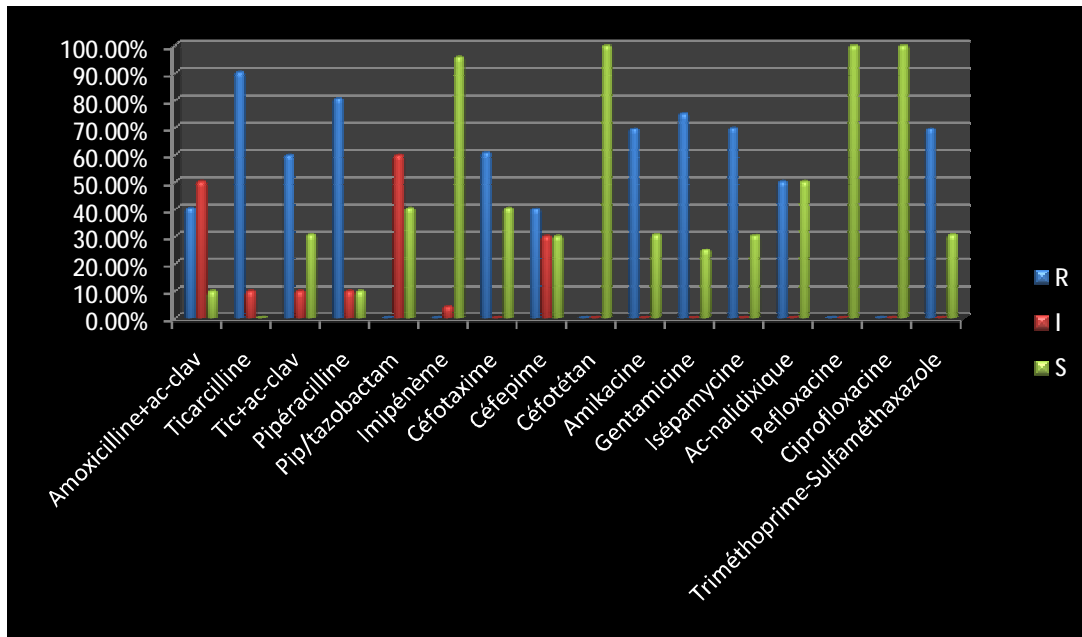


Figure 27 : Profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de réanimation.

3.4.2. Variation dans les services de chirurgie

Les souches isolées des services de chirurgie montrent plus de résistance vis-à-vis des C3G, que les souches isolées de la réanimation. 66.66% (I+R) contre 59.72% de (I+R). Les aminosides ne sont pas épargnés, la résistance s'élève à 66.66% (I+R) à l'amikacine et 77,76% à la gentamicine. En revanche, 0% de résistance est notée aussi bien pour le céfotétan que pour l'impipénème. La résistance à l'acide nalidixique s'élève à 34,44%.

Tableau 31 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans les services de chirurgie. n=31

Antibiotique	Break-point	%R	%I	%S
Amoxicilline-clav	15-20	66.66	22,58	10,76
Ticarcilline	19-21	98	2	0
Tic-ac.clav	19-21	67.76	0	32.24
Pipéracilline	13-19	86.66	0,2	10,14
Pip-tazobactam	15-20	11	44	45
Imipénème	18-21	0	0	100
Céfotaxime	16-20	66.66	0	33,34
Céfotétan	16-24	0	0	100
Céfépime	14-18	66,38	16,12	17,5
Amikacine	16	55.55	11.11	33.33
Gentamicine	15	77.76	0	22,4
Isépamycine	15-17	56,38	0	43,62
Ac-nalidixique	16-19	34.44	0	65,56
Pefloxacine	17-21	0	0	100
Ciprofloxacine	20-21	0	0	100
Triméthoprime-sulfaméthaxazole	11-15	54.44	0	45,56

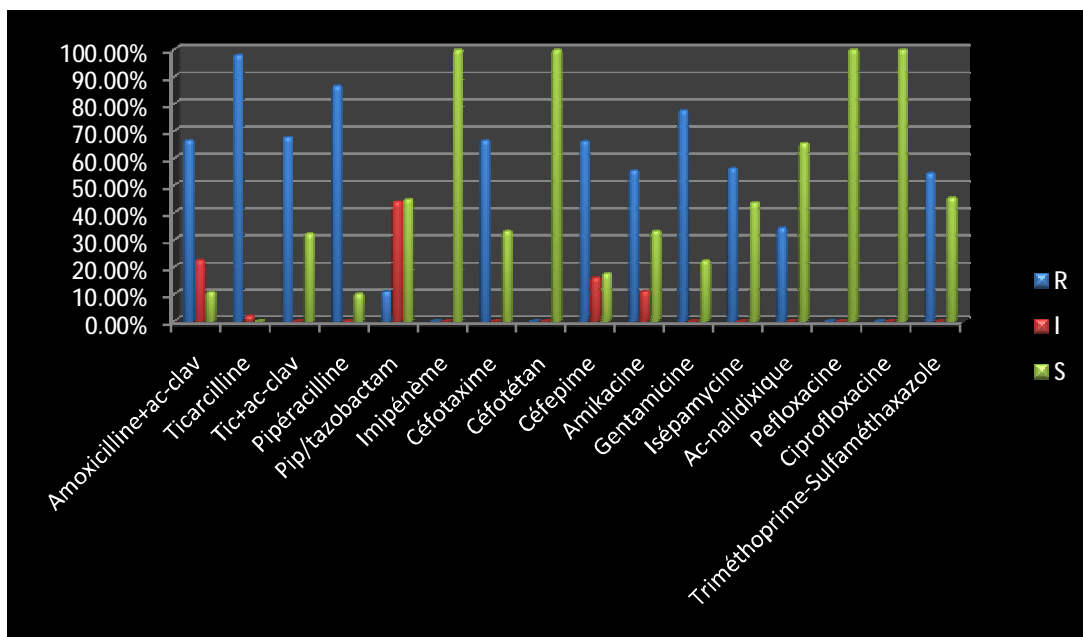


Figure 28 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans les services de chirurgie.

3.4.3. Variations dans les services de médecine.

En ce qui concerne la résistance dans les services fonctionnels de médecine interne, elle est de 72,21% (R+I) pour l'amoxicilline-ac.clavuanique (l'AMC), la combinaison ticarcilline-acide clavulanique (TCC), rétablit la sensibilité dans 38.88% contre 0% pour la ticarcilline. Pour les C3G, 60% des souches sont résistantes au céfotaxime. 53.33% de résistance est enregistrée à la fois pour l'amikacine et l'isépamycine. La résistance à la gentamicine s'élève à 66.66%. et les souches résistent dans 40% des cas à l'acide nalidixique.

Tableau 32: Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de médecine. n= 37

Antibiotique	Break-point	%R	%I	%S
Amox-clav	15-20	27.77	44.44	27.77
Ticarcilline	19-21	100	0	0
Tic+clav	19-21	38.88	22.27	38.85
Pipéracilline	13-19	73.33	6.66	20
Pip+tazobactam	15-20	13.33	26.66	60
Imipénème	18-21	0	5,40	94,59
Céfotaxime	16-20	60	13.33	26.67
Céfépime	14-18	26.66	46.66	26.66
Céfotétan	16-24	0	0	100
Amikacine	16	53.33	0	46.66
Gentamicine	15	66.66	0	33.33
Isépamycine	15-17	53.33	0	46.66
Ac-nalidixique	16-19	40	13.33	46.66
Pefloxacine	17-21	0	0	100
Ciprofloxacine	20-21	0	0	100
Triméthoprime-sulfaméthaxazole	11-15	53.33	0	46.66

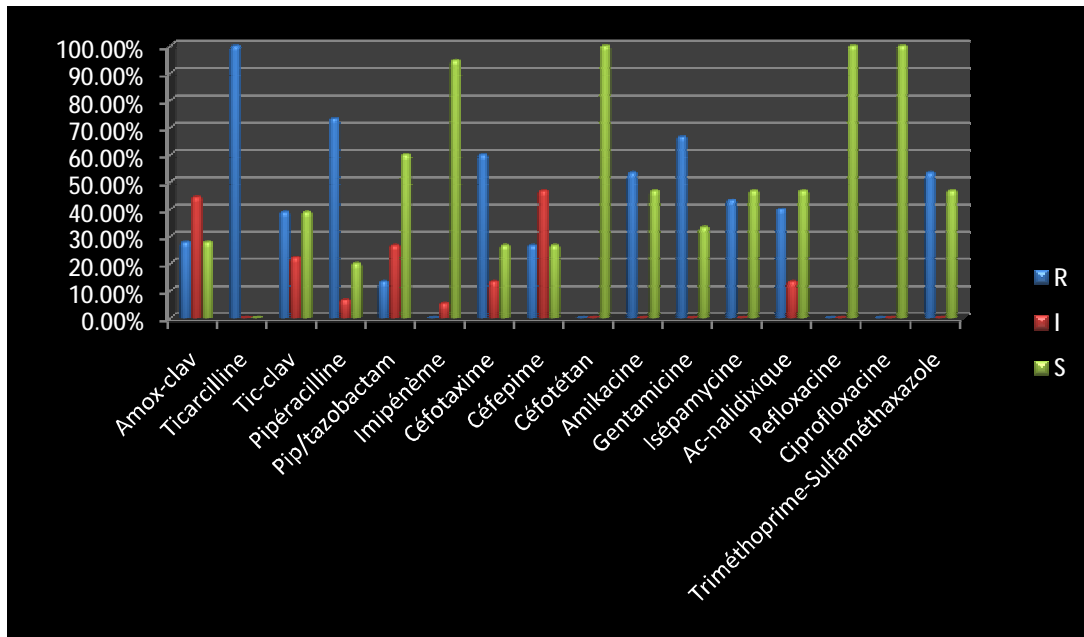


Figure 29: Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service médecine

3.4.4. Variation dans le service de néonatalogie.

Le nombre de souches colligées dans le service de néonatalogie est de 21. Ces souches montrent une résistance de 100% pour la ticarcilline et 83.32% (R+I) pour la pipéracilline. Ces importantes résistances sont partiellement levées grâce à l'effet des inhibiteurs, l'acide clavulanique et le tazobactam, respectivement pour la ticarcilline et la pipéracilline. Pour les C3G et l'amikacine la résistance est respectivement de l'ordre de 50% et 41.66%. Ces pourcentages sont manifestement plus faibles que ceux enregistrés dans les services précédemment cités. De même Pour l'acide nalidixique qui n'enregistre que 16.66% de résistance contre 40% en médecine et 50% en réanimation.

Les fluoroquinolones sont très peu utilisés en pédiatrie car elles sont toxiques pour l'enfant.

Tableau 33 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de néonatalogie. n=21

Antibiotique	Break-point	%R	%I	%S
Amox-ac.clav	15-20	50	50	0
Ticarcilline	19-21	100	0	0
Ticarcilline+clav	19-21	33.33	8.33	58.33
Pipéracilline	13-19	66.66	16.66	16.66
Pip+Tazobactam	15-20	16.66	0	83.33
Imipénème	18-21	0	0	100
Céfotaxime	16-20	50	8.33	41.66
Céfotétan	14-18	0	0	100
Céfépime	14-18	33.66	16.66	49.67
Amikacine	16	41.66	8.33	41.66
Gentamicine	15	69.66	0	33.33
Isépamicine	15-17	41.66	0	58.33
Ac-nalidixique	16-19	16.66	0	83.33
Ofloxacine	17-21	0	0	100
Ciprofloxacine	20-21	0	0	100
Triméthoprime-sulfaméthaxazole	11-15	58.33	8.33	33.33

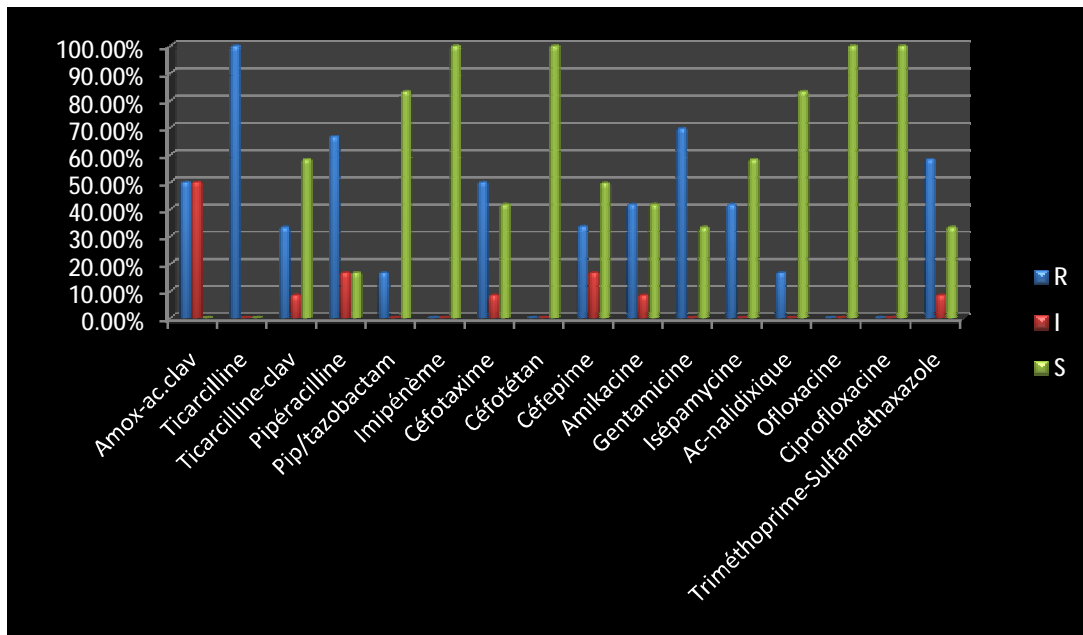


Figure 30 : Fréquence du profil de sensibilité de *K.pneumoniae* aux antibiotiques dans le service de néonatalogie.

3.5. Distribution des résistances par service (Etude comparative)

La comparaison des taux de résistance au niveau des services, nous permet d'émettre les remarques suivantes :

Les souches isolées des différents services sont beaucoup plus résistantes que les souches externes. Le profil de sensibilité aux antibiotiques dans les services montre qu'il y'a une certaine homogénéité. Et bien que les services de soins intensifs et de chirurgie restent les pourvoyeurs de souches résistantes, les services de médecine interne et de néonatalogie- pédiatrie hébergent aussi des souches résistantes aux C3G et également aux aminosides et aux sulfamides. Des souches de résistance intermédiaire à l'imipénème sont retrouvées au service de réanimation et de médecine.

Tableau 34 : Répartition des résistances par service. n= 170

Antibiotique	Externes	Réanimation	Médecine	Néonatalogie	Chirurgie
Amx/Amp	100	100	100	100	100
Amx+ac.clav	25	40.27(50)	27.77 (44.44)	50 (50)	66(22,58)
Ticarcilline	95	90.27 (9.72)	100	100	98 (2)
Tic+ac-clav	25	59.72 (9.72)	38.88 (22.27)	33.33 (8.33)	67,76
Pipéracilline	25(0,69)	80.55 (9.72)	73.33 (6.66)	66.66 (16.66)	86.66(0,2)
Pip/tazobactam	0.69 (37.5)	0 (59.72)	13.33 (26.66)	16.66	11.11 (44.44)
Imipénème	0	0(4,16)	0 (5,40)	0	0
Céfotaxime	0	60.72	60(13,33)	50 (8.33)	66.66
Céfotétan	0	0	0	0	0
Cefépime	12.5	40 (30)	26.66 (46.66)	33.66 (16.66)	66.38
Tobramycine	25	75	66.66 (22.22)	66.66	77.77
Amikacine	0 (12.5)	69.44	53.33	41.66 (8.33)	55.55 (11.11)
Kanamicine	25	74	69.33	67.66	75.66
Gentamicine	25	75	66.66	69.66	77.77
Netilmicine	0	65.33	53.33 (8.33)	40.08 (12.5)	53.66 (13.33)
Isépamycine	12.5	69,72	53.33	41.66	56,38
Ac-nalidixique	12.5	50	40 (13.33)	16.66	34.44
Ofloxacine	0	0	0	0	0
Ciprofloxacine	0	0	0	0	0
Triméthoprim-Sulfaméthaxazole	25	69.44	53.33	58.33 (8.33)	54.44

() Intermédiaire

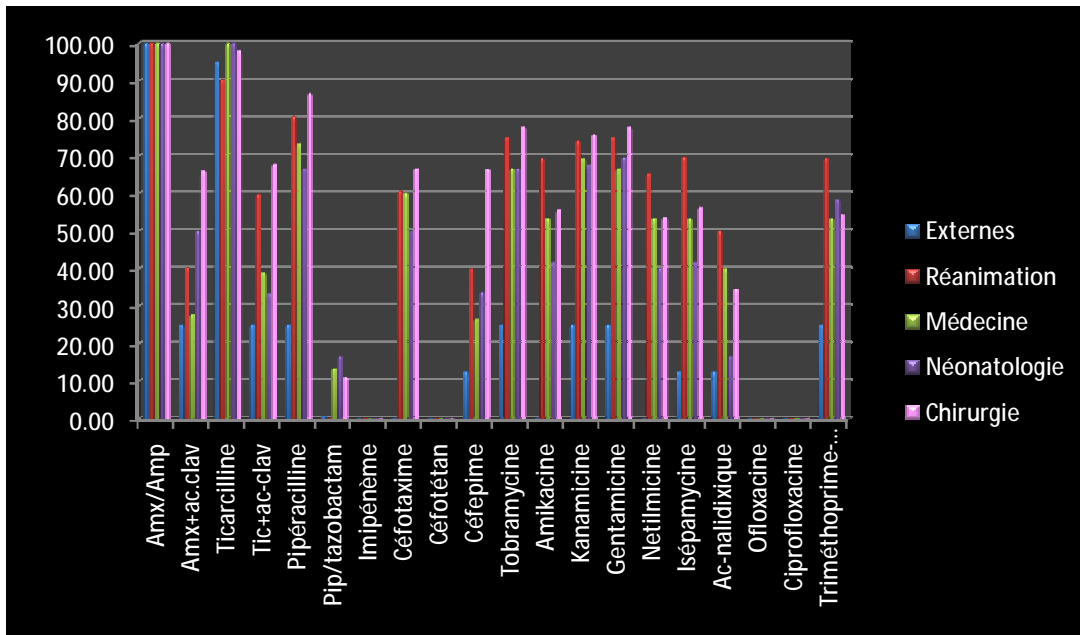


Figure 31: Répartition des résistances par service.

3.6. Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* par année

Le profil de sensibilité de *K.pneumoniae* montre une évolution progressive vers la résistance pour certains antibiotiques et plus particulièrement pour les β -lactamines. Pour les C3G, le taux de résistance reste élevé avec une moyenne de 62,38 durant les trois années. 2,94 % de souches de sensibilité intermédiaire pour l'imipénème sont retrouvées en 2004, dont trois proviennent du service de réanimation et deux du service de médecine interne. Concernant les aminosides, la gentamicine perd de son efficacité d'année en année, et passe de 68.54% en 2002 à 71.5% en 2004. L'amikacine comptée parmi les antibiotiques les plus efficaces pour les entérobactéries passe de 42,85% en 2002 à plus de 48% en 2004. Les fluoroquinolones restent les antibiotiques de choix avec 100% de sensibilité. En revanche l'acide nalidixique marque une régression d'efficacité très poussée en passant de 5.7% en 2002 à 25.64% en 2004. Cette résistance concerne surtout la réanimation où 50% des souches sont résistantes à cet antibiotique. Cette résistance touche également les souches communautaires avec un taux de 12.5%. La résistance à l'acide nalidixique est le reflet d'une pression de sélection par cet antibiotique surtout dans le traitement des infections urinaires.

D'une façon générale on peut dire qu'il y'a diminution de sensibilité d'année en année, pour la majorité des antibiotiques bien que la différence dans la résistance entre

2002 et 2004 est statistiquement non significative, avec un $p > 0,005$. Cette situation inquiétante aussi bien pour le clinicien que pour le biologiste, avec toutes ses conséquences écologiques, économiques, pourrait être palliée par une utilisation rationnelle et justifiée des antibiotiques.

Tableau 35 : Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* par année. n=170

Antibiotique	Break-point	2002 n=48	2003 n=42	2004 n=80
Amx/Amp	15-18	100	100	100
Amx+ac.clav	15-20	43,59	44,28	48,3
Ticarcilline	19-21	95,59	100	96
Tic+ac-clav	19-21	59,78	63,85	62,76
Pipéracilline	13-19	83	86,28	84,51
Pip/tazobactam	15-20	9,74	8,85	9,0
Imipénème	18-21	0	0	0
Céfazoline	13-17	74,3	74,28	76,69
Céfoxitine	16-21	100	100	100
Céfotaxime	16-20	60,39	65,57	61,2
Ceftazidime	16-20	58,55	62,1	60,46
Céfotétan	16-24	0	0	0
Aztréonam	18-22	62,1	65,57	60,76
Céfépime	14-18	37,42	28,57	34,33
Tobramycine	15	65,68	71,25	67
Amikacine	16	48,12	42,85	48,1
Gentamicine	15	68,54	71,5	69,24
Isépamycine	15-17	48,12	42,85	48,1
Ac-nalidixique	16-19	5,7	15,64	25,64
Pefloxacine	17-21	0	0	0
Ciprofloxacine	20-21	0	0	0
Triméthoprime-Sulfaméthaxazole	11-15	55,38	68,72	66,67

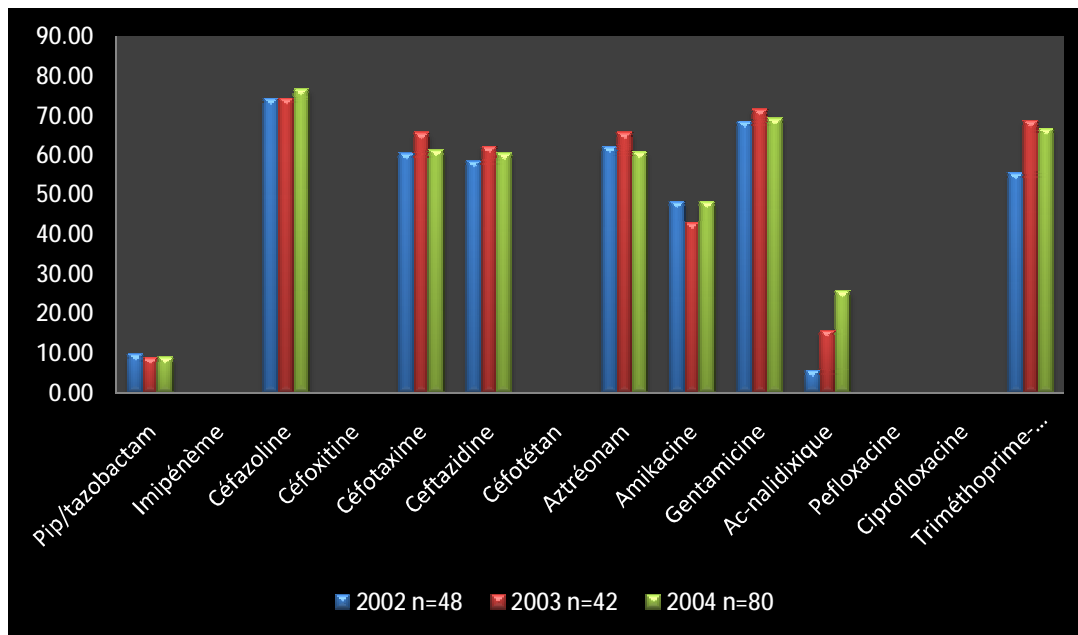


Figure 32: Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* par année.

3.6.1. Répartition des résistances de *K.pneumoniae* aux antibiotiques en fonction du prélèvement.

Pour cette étude comparative, seuls les trois principaux prélèvements ont été pris en considération. Le tableau ci-dessous indique que les fréquences de résistance les plus élevées observées dans les hémocultures, spécialement pour les C3G 66.67% contre 60% (pus) et 52% (urines). La même prévalence est observée pour les aminosides, où la gentamicine atteint les 88.33% dans les hémocultures, contre 55% pour les prélèvements de pus, et 42% dans les prélèvements urinaires. Des raisonnements analogues vont aussi pour l'amikacine, et les sulfamides. Cette différence marquée concerne aussi l'ac-nalidixique qui enregistre un taux de résistance de 33.33% pour les hémocultures, contre 22% pour le pus et 32% pour les urines.

Tableau 36 : Répartition des résistances de *K.pneumoniae* aux antibiotiques en fonction du prélèvement

Antibiotique	Hémoculture n=51	Pus n=79	Urines n=40
Amx/Amp	100	100	100
Amx+ac.clav	41.67	43,5	36.33
Ticarcilline	100	95	96
Tic+ac-clav	66.67	55	43,33
Pipéracilline	91.67	87	89.4
Pip/tazobactam	10	9,2	11.94
Imipénème	0	0	0
Céfazoline	71.67	60	72.22
Céfoxitine	0	0	0
Céfotaxime	66.67	60	52
Ceftazidime	58.33	60	51.1
Céfotétan	0	0	0
Aztréonam	65.33	58	57
Cefépime	41.67	35	32,6
Tobramycine	66.67	50	52.22
Amikacine	46.67	35	32.4
Gentamicine	88.33	65	53.33
Iséпамycine	46.67	35	32.4
Ac-nalidixique	33.33	22	32.22
Pefloxacine	0	0	0
Ciprofloxacine	0	0	0
Triméthoprim- Sulfaméthaxazole	68.33	55	51.7

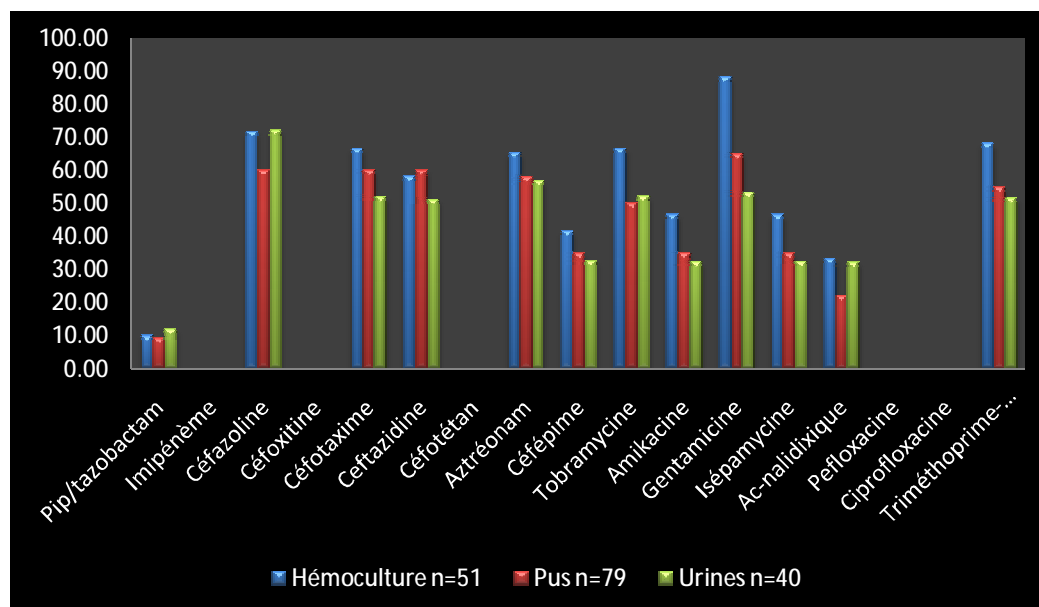


Figure 33: Répartition des résistances de *K.pneumoniae* aux antibiotiques en fonction du prélèvement

3.7. Distribution globale des principaux phénotypes de résistance aux antibiotiques

3.7.1. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines

Quatre phénotypes de résistance aux β -lactamines, dont un sauvage sont représentés dans notre étude. Celui des BLSE domine dans 62% des cas, suivi de celui du type sauvage dans 27%, du type PHN dans 8% et du type TRI plus rare dans 3% des cas.

Tableau 37: Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines. n=170

Phénotype de résistance	Fréquence %
BLSE	62
PBN	27
PHN	8
TRI	3

BLSE: β -lactamases à spectre élargi. PBN : Pénicillinase de bas niveau, PHN : Pénicillinase de haut niveau, TRI : TEM résistant aux inhibiteurs de β -lactamases.

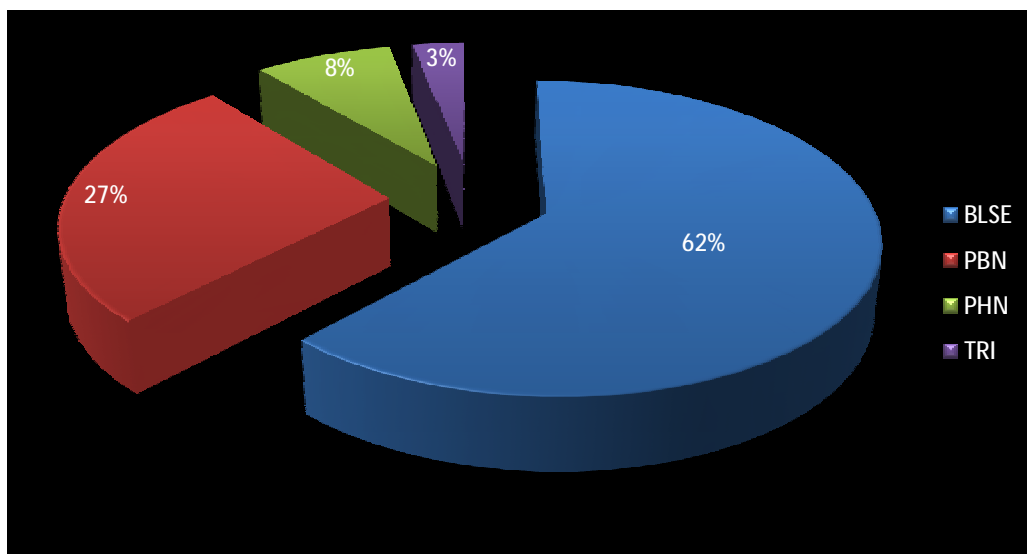


Figure 34 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines

3.7.1.1. Principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines et résistances associées.

Les BLSE montrent les plus forts taux de résistance associées, surtout à la gentamicine qui atteint les 100%. Les taux les plus faibles concernent le phénotype sensible.

Antibiotique Phénotype	GN	AM	SXT	NAL
PBN	12,5%	0%	25%	12,5%
PHN	25%	25%	62,5%	37,5%
BLSE	100%	71,87%	78,12%	40,62%

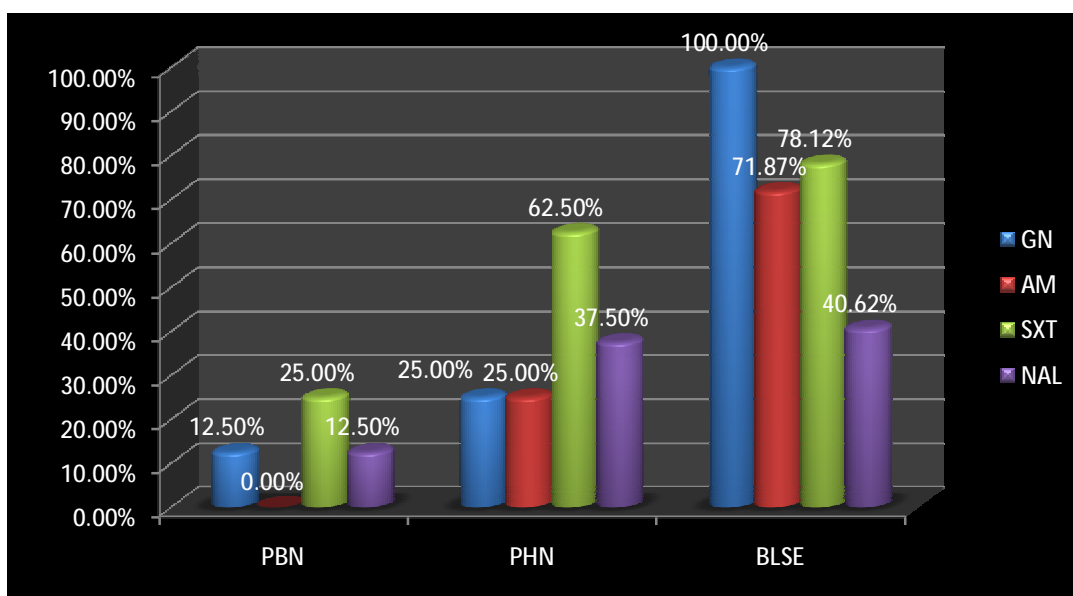


Figure 35: Résistances associées aux phénotypes de résistance aux β -lactamines

3.7.1.2. Répartition des 105 souches de *K.p* productrices de BLSE en fonction des services

Les résultats illustrés dans le tableau ci-dessous montrent que la population des *K.p* BLSE+ varie en fonction des services. Le service de réanimation reste de loin le pourvoyeur essentiel de ces souches (45,71%), suivi du service de médecine avec une fréquence de 21,90%. Le service de néonatalogie marque le plus bas nombre en *K.p* BLSE+ par rapport au nombre total des *K.p* BLSE+.

Tableau 38: Répartition des 105 souches de *K.p* productrices de BLSE en fonction des services

Service	Nombre et fréquence de <i>K.p</i> BLSE+
Réanimation	48 (45,71%)
Médecine	23 (21,90%)
Chirurgie	20 (19,04%)
Néonatalogie	14 (13,33%)
Total	105 (100%)

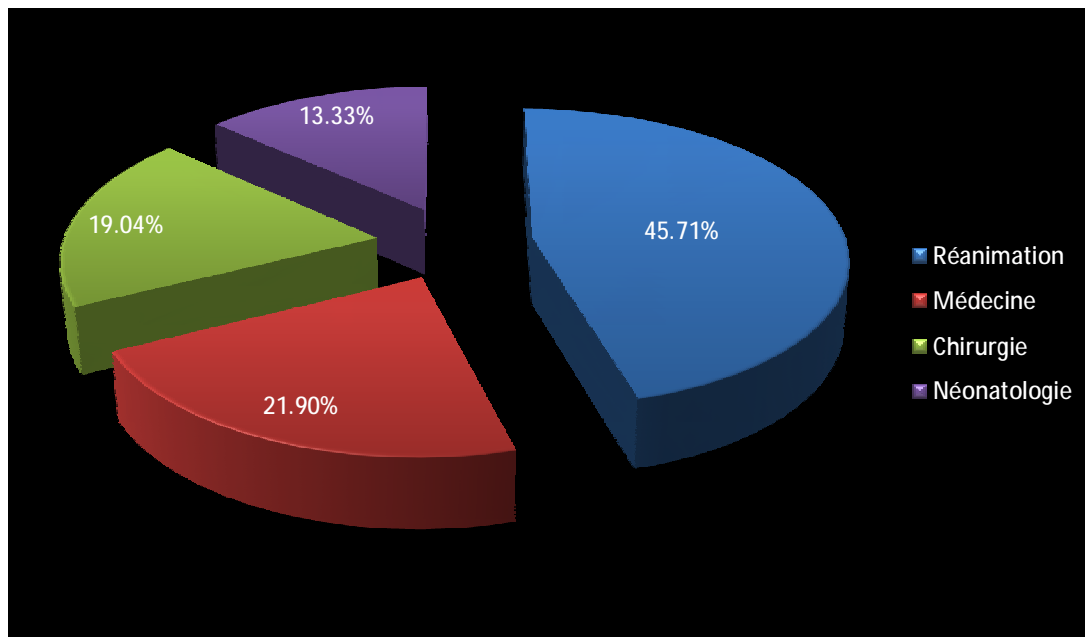


Figure 36: Répartition des 105 souches de *K.p* productrices de BLSE en fonction des services

3.7.1.3. Répartition des *K.p* BLSE+ selon le type de prélèvement

Notre étude montre que la distribution des *K.p* BLSE+ varie selon le type de prélèvement, ainsi le nombre le plus important est noté pour les prélèvements de pus avec une fréquence de 52.38%, suivi des prélèvements de sang qui enregistrent une fréquence de 41.66% de *K.p* BLSE+. En revanche les urines enregistrent le taux le plus faible, après les sécrétions respiratoires. En plus des résistances importantes pour les C3G, ces *K.p* BLSE+ présentent des résistances associées très marquées, aux aminosides, à l'acide nalidixique et à l'association triméthoprime sulfaméthaxazol.

Tableau 39: Répartition des *K.p* BLSE+ selon le type de prélèvement. N=105

Prélèvement	Nombre total de <i>K.p</i>	Nombre et fréquence de <i>K.p</i> BLSE+
Pus et sérosité	79	58 (55.23%)
Sang	51	32 (30,47)
Urines	40	15 (14,28)
Total	170	105 (100%)

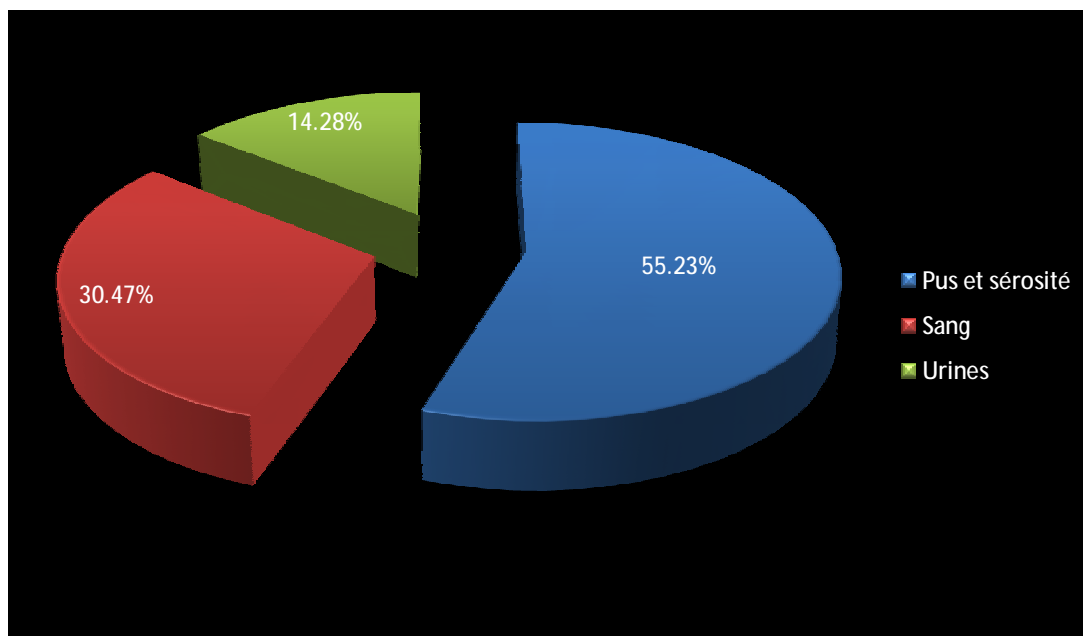


Figure 37 : Répartition des *K.p* BLSE+ selon le type de prélèvement

3.7.2. Antibiotypes de *K.pneumoniae* productrice de BLSE.

Parmi la population des *K.pneumoniae* productrices de BLSE, 4 antibiotypes sont retrouvés (a1, a2, a3 et a4).

Le tableau ci-dessous montre que les 4 antibiotypes des *K.p* BLSE+ présentent des résistances au cefotaxime (ce qui est normal), mais pour la ceftazidime c'est variable : a1 et a3 sont entre sensible et intermédiaire, pour le a2 c'est variable, et le a4 est intermédiaire. Ce qui nous permet de penser à des β -lactamases de type CTX-M, enzymes décrites depuis quelques années chez les entérobactéries.

Ces *K.p* BLSE+ présentent des résistances associées aux aminoglycosides mis à part les souches du a1 qui sont sensibles à l'amikacine, ainsi que des résistances

associées aux sulfamides et à l'acide nalidixique. L'imipénème et les fluoroquinolones restent très actifs vis-à-vis de ces BLSE.

Tableau 40: Antibiotypes de *K.pneumoniae* productrice de BLSE. N= 105

Substrat	Antibiotype β -lactamases			
	a1	a2	a3	a4
Cefotaxime	R-I	R-I	R	R
Ceftazidime	S-I	V	S-I	R
Aztréonam	I	V	I-R	R
Gentamicine	R	R	R	R
Tobramicine	R-S	R	R	R
Amikacine	S	R	R	R
Co-Trimoxazole	S	R	R	S
imipénème	S	S	S	S
Ac-nalidixique	R	S	R	S

a : antibiotype, R : Résistant, S : Sensible, V : variable

3.7.3. CMI moyennes *K. pneumoniae* selon le phénotype.

Pour la caractérisation des *K.p* BLSE+, cinq souches de 2002, cinq de 2003 et cinq de 2004 ont été choisies parmi le panel des *K.p* BLSE+. Les CMI des antibiotiques des 15 BLSE+ ont été mesurés sur Viteck (automate). Pour les trois phénotypes, les CMI à cefoxitine et à l'imipénème sont basses et donc actives. Les BLSE ont des CMI élevées pour la cefazoline et le cefotaxime.

Tableau 41 : CMI moyennes *K. pneumoniae* selon le phénotype. n= 52

ATB	AMX	AMC	TIC	TCC	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	IPM
PBN	>=32	<=2	>=128	<=8	<=4	<=2	<=4	1<=	<=1	<=1
PHN	>=32	13	>=128	59	<=4	46	5	3	2	<=1
BLSE	>=32	18	>=128	73	12	>=64	<=4	64	14	<=1

3.7.4. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux aminosides.

La répartition des phénotypes de résistance aux aminosides montre une nette prédominance du phénotype KGTNt caractéristique de la *K.p* avec une fréquence de 41%, suivi du phénotype sauvage avec une fréquence de 27%. Le phénotype KTGAnT dû à une association d'enzymes ou à une imperméabilité enregistre un taux

de 10%. En revanche c'est le phénotype G (résistance isolée à la gentamicine) qui marque la plus faible fréquence de 2.35%.

Tableau 42 : Répartition (%) des principaux phénotypes de résistance aux aminosides chez *K.pneumoniae*. n = 170

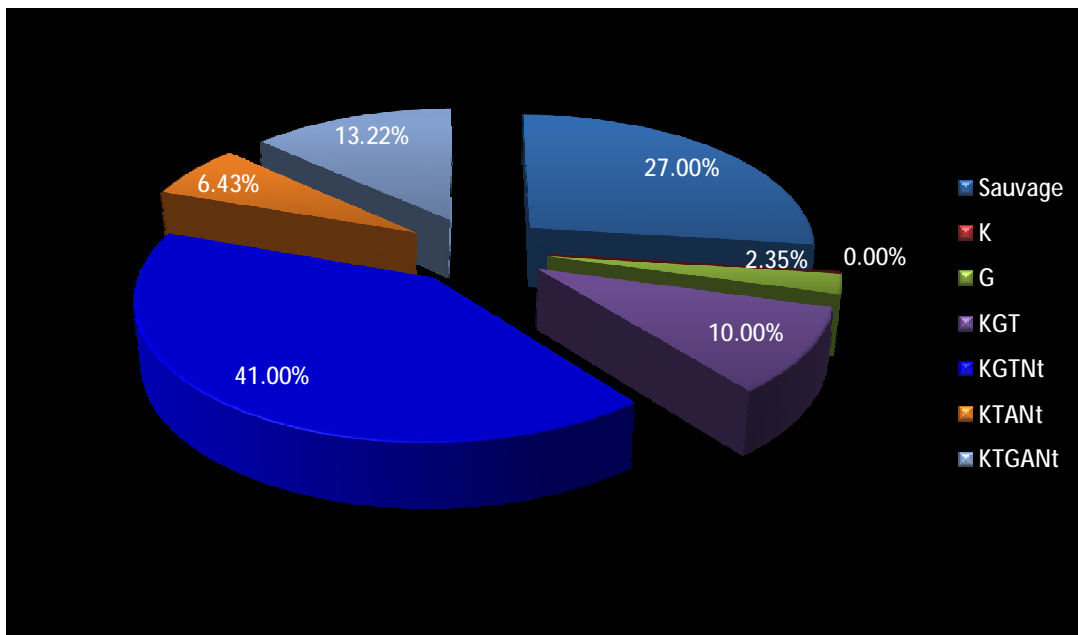


Figure 38 : Répartition (%) des principaux phénotypes de résistance aux aminosides chez *K.pneumoniae*.

3.7.5. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux quinolones

Le phénotype sauvage sensible est le plus fréquent, (65.38%), le phénotype, conférant une résistance à l'ac-nalidixique est retrouvé dans 34.61% des cas. Les phénotypes conférant la résistance aux fluoroquinolones ne sont pas représentés vu que nos souches sont complètement sensibles à la ciprofloxacine et à l'ofloxacine.

Tableau 43 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux quinolones, chez *K.pneumoniae*. n=170

Phénotype	I (sauvage)	II	III	IV
Pourcentage	65.38%	34.61%	0%	0%

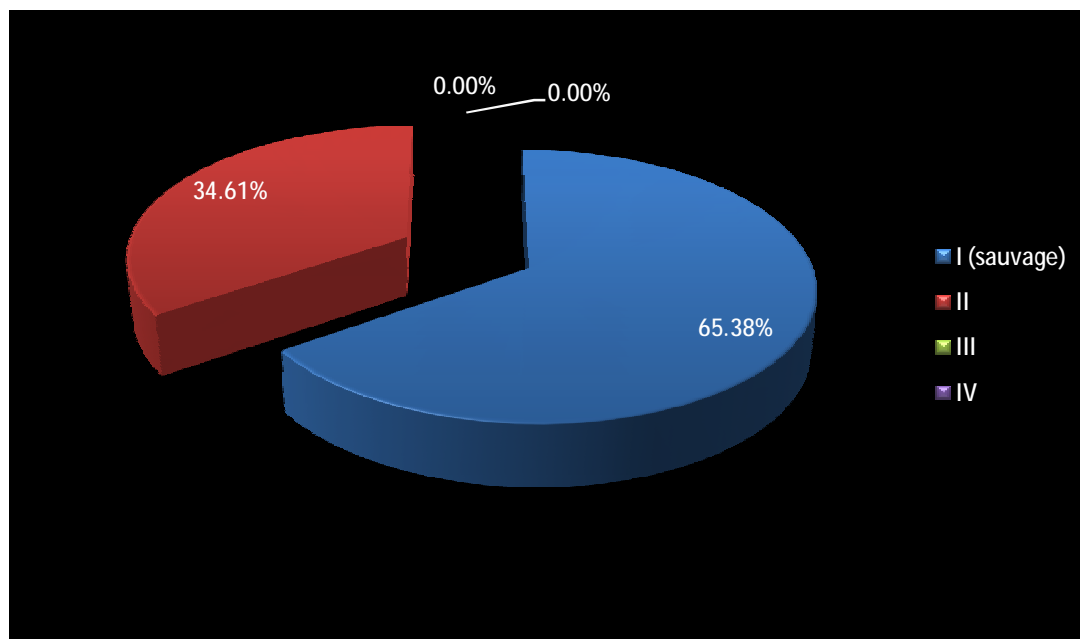


Figure 39 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux quinolones, chez *K.pneumoniae*. n=170

Tableau 44 : Légende des phénotypes de résistance aux quinolones Jehl et al (2003)

	Nal	NOR	PEF	OFX	CIP
I	S	S	S	S	S
II	R	S	S	S	S
III	R	I/R	I/R	S	S
IV	R	R	R	R	R
Autres	S	R	S	S	S

4. Résultats de la biologie moléculaire

4.1. Electrophorèse en champ pulsé

Les profils de migration obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *Spe I* sont représentés dans la figure 40.



Figure 40: Les profils de migration obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *Spe I* de l'ADN bactérien des 52 souches de *Kp* ayant servi à la biologie moléculaire.

Pour comparer les souches étudiées et évaluer le pourcentage de similitude entre elles, les pulsotypes ont été analysés par analyst, Biorad (France).

Les étapes suivantes se succèdent pour le traitement du gel d'électrophorèse :

- définition de la zone du gel à analyser
- correction des distorsions des bandes

- normalisation : toutes les lignes (profils) doivent être comparables entre elles si la migration n'a pas été équivalente sur l'ensemble du gel, le même échantillon positionné dans le premier et le dernier puit du gel peut servir de standard pour cette normalisation
- définition des standards des profils de références (profil du phage λ , profil de la souche de référence...), localisation des bandes de références
- sélection des bandes : définir les zones actives, c'est-à-dire les <<vraies>> bandes en éliminant les artefacts s'il y en a.

Après cette préparation de l'image, les profils peuvent être comparés et visualisés sous la forme d'un dendrogramme avec les pourcentages de similarité existants entre les souches analysées. (Figure 41)

L'interprétation des résultats est basée sur les critères suivants:

- Minimum de 10 bandes requis par profil
- Profil identique : même souche
- Différence de 1 à 3 bandes : probablement relié
- Différence de 4 à 6 bandes : possiblement relié
- Plus de 6 bandes différentes : Souches non reliées selon les critères de Tenover

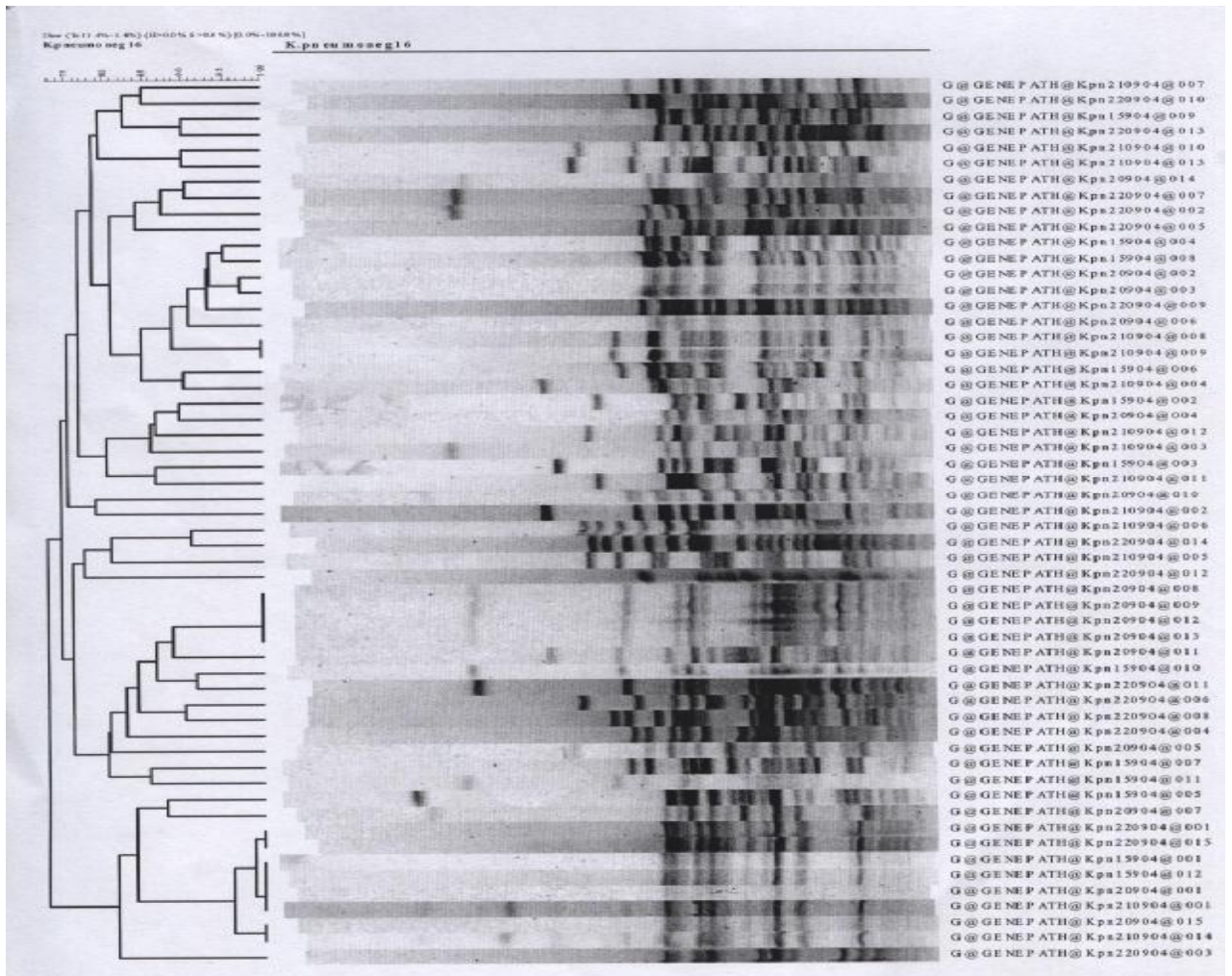


Figure 41: Dendrogramme représentatif de l'électrophorèse en champ pulsé

Parmi les 52 souches étudiées, L'ECP a individualisé 32 pulsotypes, dont la dispersion dans le temps et l'espace semble permettre de formuler en premier lieu les remarques suivantes :

- Les services sont colonisés par des souches aux pulsotypes différents
- Il y'a co-existence de plusieurs souches dans un même service

Une même souche colonise un service sur une longue période de temps (2003-2004), c'est le cas du service de la médecine interne et de la réanimation, où l'on assiste à la présence de souches regroupées dans un même clone, mais certaines isolées en 2003 et d'autres en 2004.

L'analyse du dendrogramme (figure 41) à partir des résultats des gels d'électrophorèse a montré que 24 souches sur les 52 sont classées dans 4 clones différents, tandis que les 28 autres appartiennent chacune à un clone unique ou isolé.

Sur les 24 souches des 4 clones, nous avons dénombré 17 *K.p* BLSE +.

- Le premier clone contient 4 souches hospitalières dont 3 *K.p* BLSE+. Deux des *Kp* BLSE(+) ont été isolées successivement en mars et mai 2004, la première isolée d'une sonde vésicale au niveau du service de réanimation, la seconde d'urines au niveau du service de médecine interne, la troisième *Kp* BLSE (+) a été isolée en 2003 d'une hémoculture (service de médecine interne), la 4^{ème} souche, isolée en Avril 2004 d'un prélèvement de pus dermique, du service de réanimation.
- Le deuxième groupe clonal comprend 10 souches dont 5 *Kp* BLSE +. Une *Kp* BLSE + isolée en 2003 du service de réanimation, à partir d'une aspiration trachéale. Les quatre autres *Kp* BLSE (+) ont été isolées en 2004 essentiellement du service de réanimation (3 hémoculture et une aspiration trachéale), Ceci souligne que la situation en réanimation est ancienne et qu'elle persiste. Les 5 souches restantes sont isolées de prélèvements et de services différents, cependant elles ont toutes été isolées entre avril et juin 2004.
- Le troisième clone contient 6 souches dont 5 *Kp* BLSE (+). Ces *Kp* BLSE (+) ont été isolées entre avril et juin 2004, 3 provenant du service de médecine, deux prélevées des hémocultures et une du pus). La quatrième prélevée de pus de plaie au niveau du service de chirurgie, la cinquième prélevée également de pus au niveau du service d'orthopédie. La 6^{ème} souche du clone a été isolée en avril 2003 d'une hémoculture du service de neurologie. Cette souche présente une résistance élevée au céfotaxime ; ainsi que pour les 5 aminosides testés.
- Le quatrième clone comprend 4 souches dont 3 *K.p* BLSE (+) et une souche sauvage. Les *Kp* BLSE (+) ont été recueillies entre janvier et avril 2004. Une souche Prélevée des urines au niveau du service de chirurgie, les deux autres de deux sondes vésicales au service de réanimation. La souche sauvage a été prélevée en février 2004 du service de néonatalogie (sonde vésicale).

A première vue ces résultats nous permettent d'émettre les conclusions suivantes:

D'une part sur la période de janvier à juin qui enregistre le plus grand nombre de souches, le même service peut héberger plusieurs clones regroupant des souches différentes, ce qui exclut l'hypothèse du même clone et donc de la diffusion épidémique. D'autre part l'analyse du 3^{ème}

clone nous signale encore une fois que les souches de ce clone sont dispatchées (dispersées) dans différents services.

4.2. Caractérisation génétique des BLSE:

La caractérisation génétique des 15 K.p BLSE+ grâce à la PCR a révélé la présence d'une BLSE de type CTX-M-3, quelque soit son clone indiqué par l'ECP.

5. Analyse statistique

L'analyse des variables (les 22 antibiotiques testés) a montré que la plus grande corrélation a été notée entre la gentamicine et le triméthoprime-sulfaméthaxazole (SXT) où l'indice de corrélation $r = 0,943$ et entre la tobramicine et la gentamicine où $r = 0,905$. L'étude des individus (les 52 souches ayant servi à la biologie moléculaire) a permis de les regrouper en cinq groupes distincts, la distance (D =distance de Mahalanobis) et l'éloignement de ces groupes ont été calculés.

D'après les résultats illustrés dans la figure 42, on remarque que le groupe 5 est très éloigné du groupe 4 ($D = 6.8965$) et le groupe 2 et 3 sont les plus rapprochés ($D = 1.7825$). Si l'on se réfère à la composition du groupe 4 et 5 cela se vérifie, puisque les souches du groupe 4, sont pour la plupart des sauvages, excepté une souche et qui est une PHN (pénicillinase de haut niveau). Le groupe 5 comprend une seule souche et qui s'avère une BLSE.

Les groupes 2 et 3 sont constitués de souches qui sont pour la plupart des BLSE et qui avaient pratiquement les mêmes antibiogrammes. Pour le pourcentage de bien classées, on remarque que les cinq souches appartenant au groupe 1 sont restées à 100% affectées au groupe 1. Sur un total de 24 souches du groupe 2, 22 souches sont restées affectées au groupe 2 et seulement 2 ont été déplacées au groupe 3. Sur les 13 souches du groupe 3, 8 sont restées au même groupe, cependant 3 ont été affectées au groupe 2, et 2 souches au groupe 1.

Le groupe 4 comporte 9 souches, dont 8 ont conservé leur affectation et seulement une souche a été déplacée au groupe 1. L'unique souche du groupe 5 est restée au groupe 5.

PLAN 1 2

AXE 1 HORIZONTAL

AXE 2 VERTICAL

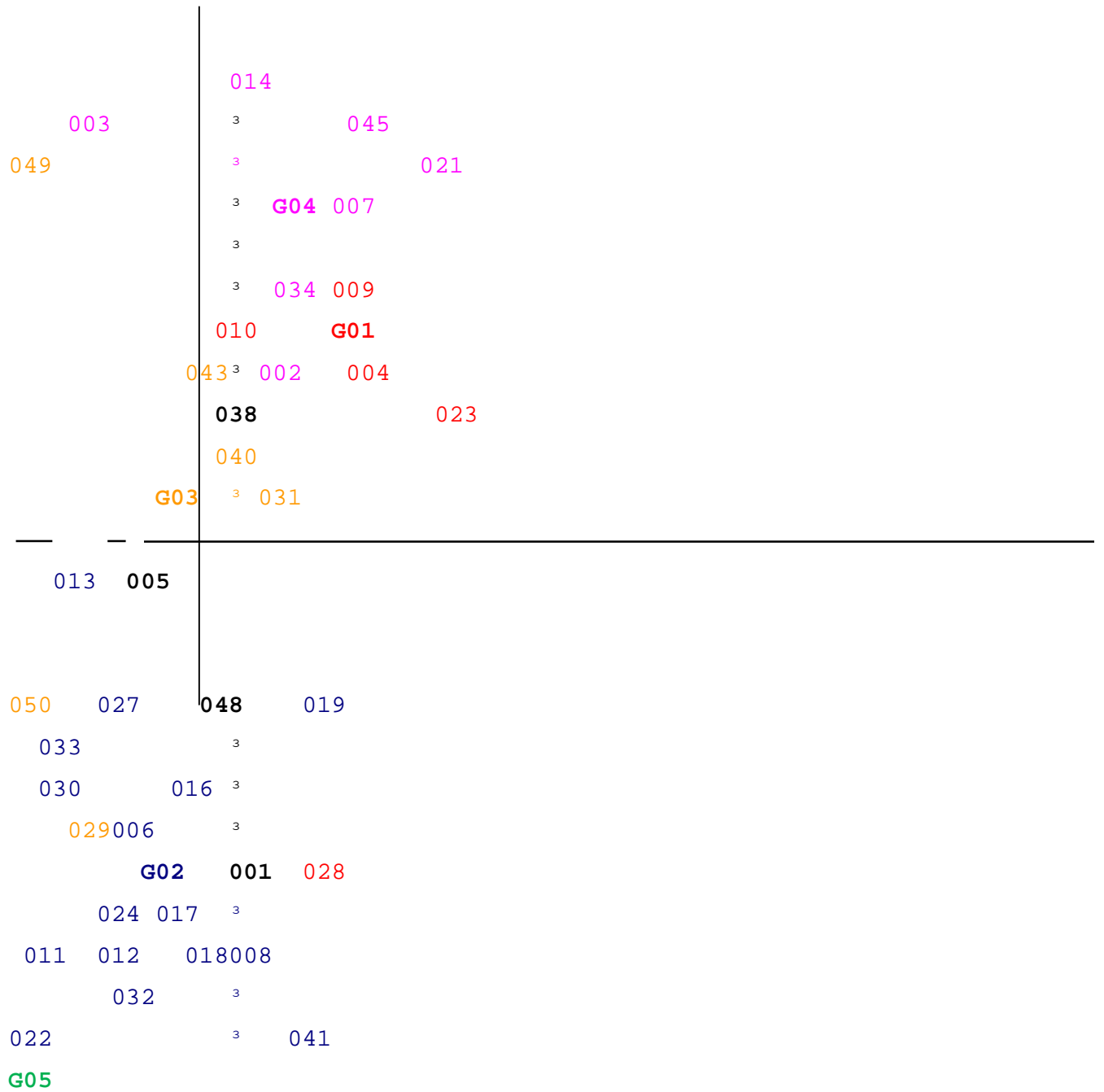


Figure 42: Résultats de l'analyse factorielle discriminante.

POINTS CACHES

Points vus	Points cachés	ABSCISSE	
ORDONNEE			
006	015	-.3007089	-
.5970381			
006	020	-.322489	-
.6800554			
002	025	.1636179	
.6326579			
007	026	.6004651	
1.308702			
028	035	.2208441	-
.8992627			
006	036	-.5499436	-
.6538999			
G05	037	6.326998	-
1.586658			
001	039	.1955173	-
.8714625			
009	042	.3487322	
1.020343			
006	044	-.723414	-
.594588			
029	046	-.6350032	-
.6583866			
014	047	.0822582	
1.903665			
010	051	2.510233 ^E	-02
.8992165			
033	052	-.7005212	.
-.241845			

6. Résultats du génotype, du biotype et de l'antibiotype

Le tableau (45) ci-dessous, est une superposition des résultats de la biotypie, de l'antibiotypie et de la pulsotypie.

Les 52 souches représentées dans le tableau ci-dessous ont fait l'objet d'une étude génotypique par ECP.

Le biotype B1, représente le profil numérique 5215573 (inositol-) avec 8 souches (3, 8, 9, 22, 24, 25, 37, 41), le B2 est le profil 5215773, qui est le profil dominant et caractéristique de la K.p, avec 25 souches(4, 5, 7, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 26, 29, 31, 32, 34, 35, 38, 40, 43, 45, 51, 52), le B3 est le 5205773 (Urée-) avec 10 souches (14, 27, 28, 30, 39, 42, 47, 48, 49, 50), le B4 est le profil 5214773 (VP-), avec 8 souches (1 2 6 13 20 33 44 46) et enfin le B5 qui est le 5205573 (Urée- et inositol-) c'est le profil rare ne comportant qu'une seule souche, (la souche n° 37).

L'antibiotype A1 représente le type sauvage avec 7 souches (45, 46, 47, 48, 49, 50, 51)

L'antibiotype A2 comportant 20 souches (5, 6, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 32, 33, 35, 36, 39, 41, 44) des BLSE résistantes à tous les aminosides testés et sulfamides (Co-Trimoxazole),

L'antibiotype A3 comprend 8 souches toutes des BLSE résistantes à la gentamicine, à l'amikacine et au co-trimoxazole

L'antibiotype A4 comprend 5 souches (52, 43, 34, 31, 28) résistantes à la céfazoline.

Le tableau ci-dessous montre encore une fois que le génotype (ECP) est plus discriminant que les deux méthodes phénotypiques (antibiotypie, et biotypie), puisque ces deux derniers classent les 52 souches en 5 groupes distincts, alors que l'ECP a regroupé 24 souches en 4 clones différents, chacun regroupant un certain nombre de souches, et sépare bien les 28 restantes en des clones tous différents les uns des autres, isolés ou uniques, sans liaison épidémiologique.

Ainsi si l'on prend les 7 souches de l'antibiotype A1 La: 45, 46, 47 48 49 50 51 et qui sont toutes des sauvages, le biotype les regroupe comme suit: la 45 et la 51 dans le B2 (profil type de la K.p), la 46 au B4 (VP-), tandis que les 4 autres: 47 48 49 50 regroupées dans le B3 souches à Uréase négative. Le pulsotype les sépare encore plus, puisque les souches 45, 48, 49, 50, 51 chacune présente un pulsotype unique ou isolé. La souche 46 est dans le clone G4 qui regroupe d'autres souches, la souche 47 est au G2 comprenant également d'autres souches. Ainsi pour les 7 souches du même antibiotype, le biotype les affecte dans trois groupes

différents, où le premier comprend 4 souches, et le second deux souches, et le troisième une seule souche.

Ces mêmes souches sont considérées très hétérogènes par l'ECP qui affecte chacune des 7 souches dans un pulsotype différent.

Il en va de même pour l'A2, cet antibiotype qui regroupe le plus grand nombre de souches (20) par rapport aux autres antibiotypes. Cet antibiotype concerne les BLSE+ résistantes aux aminoglycosides testés et aux sulfamides. Ces mêmes souches sont affectées à 5 biotypes différents, mais l'ECP les affecte dans 12 groupes différents et considérant les souches: 8, 15, 16, 19, 20, 44, 33, de pulsotypes uniques.

13 des clones unique ou isolé et affecte les souches qui restent dans les clones G1 G2 G3 et G4. Mais ce qui est encore remarquable est que par exemple au sein du biotype B2 qui regroupe les souches: 5, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 32, et 35, le pulsotype les distingue encore plus et considère les souches: 15, 16, et 19 comme clone unique et isolé.

Pour l'antibiotype A5 qui regroupe une seule souche n° 37, il s'agit d'une BLSE+ avec la particularité d'être sensible à tous les aminosides testés et aux sulfamides, contrairement aux autres BLSE+ de la série d'étude. Pour le biotype, elle est inositol- (ne fermente pas ce sucre) et présente un pulsotype unique.

On remarque alors que l'ECP révèle bien le polymorphisme des souches qui n'apparaît pas avec l'antibiotypie et la biotypie.

Tableau 45 : Résultats du génotype (G), du biotype (B) et de l'antibiotype (A)

Souche n°	Prélèvement	Génotype	Biotype	Antibiotype
1	Pus	Unique	B4	A2
2	Liquide pleural	Unique	B4	A4
3	Sang	Unique	B1	A1
4	Sang	Unique	B2	A3
5	Aspiration trachéale	G2	B2	A2
6	Sang	G2	B4	A2
7	Sonde vésicale	Unique	B2	A2
8	Sang	Unique	B1	A2
9	Pus	G1	B1	A1
10	Sang	G1	B2	A2
11	Aspiration trachéale	G2	B2	A2
12	Sang	G4	B2	A2
13	Sonde vésicale	Unique	B4	A2
14	Pus	Unique	B3	A4
15	Pus	Unique	B2	A2
16	Sonde vésicale	Unique	B2	A2
17	Aspiration trachéale	G2	B2	A2
18	Sang	G2	B2	A2
19	Aspiration trachéale	Unique	B2	A2
20	Sang	Unique	B4	A2
21	Pus	Unique	B2	A4
22	Pus	G2	B1	A2
23	Sang	Unique	B2	A3
24	Pus	G1	B1	A2
25	Pus	Unique	B1	A3
26	Pus	G1	B2	A3
27	Pus	G4	B3	A2
28	Sang	G2	B3	A4
29	Urine	G3	B2	A3
30	Pus	Unique	B3	A2
31	Pus	Unique	B2	A4
32	Sang	G2	B2	A2
33	Sang	Unique	B4	A4
34	Sonde vésicale	G4	B2	A4
35	Sang	G2	B2	A2
36	Sang	G3	B5	A2
37	Pus	Unique	B1	A5
38	Sang	Unique	B2	A3
39	Sonde vésicale	G3	B3	A2
40	Sang	G1	B2	A3
41	Sang	G1	B1	A2
42	sepsi pariétal	Unique	B3	A3
43	Pus	G3	B2	A4
44	Sang	Unique	B4	A2
45	Pus	Unique	B2	A1
46	Urine	G4	B4	A1
47	Pus	G2	B3	A1
48	Urine	Unique	B3	A1
49	Urine	Unique	B3	A1
50	Urine	Unique	B3	A1
51	Urine	Unique	B2	A1
52	Pus	Unique	B2	A4

Discussion

Discussion

Au cours de notre étude, nous avons présenté les principales caractéristiques épidémiologiques de souches de *K.pneumoniae* isolées entre 2002 et 2004 au CHU de Constantine et évalué l'activité des β -lactamines, des aminosides et des quinolones, principaux antibiotiques bactéricides, sur des souches présentant différents phénotypes de résistance.

Plus de 1/3 des souches a fait l'objet d'une caractérisation génotypique.

1. Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae*

La fréquence d'isolement annuelle de *K.p* au CHU Benbadis de Constantine est variable d'une année à l'autre, avec une moyenne de 400 souches par an. Dans notre étude, étalée sur 18 mois, de 2002 à 2004, nous avons colligé 170 souches de *K.p* de malades hospitalisés et consultants externes. Le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques (2008) rapporte que sur 3277 bactéries multirésistantes toutes espèces confondues, isolées en milieu hospitalier et sur un effectif global de 13620 isolats *K.p* vient en tête avec 31,5% des cas.

2. Sexe

Notre étude montre que la fréquence de *K.pneumoniae* est supérieure chez le sexe masculin (54.11%) par rapport au sexe féminin (45.88%). Mais cette différence reste statistiquement non significative, avec un $\chi^2 > 0,005$. Ce critère physiologique ne semble pas influencer les infections nosocomiales. Selon le sexe la fréquence d'isolement est statistiquement non significative comme le rapportent Kariuki et al (2007). Par contre l'âge (que nous n'avons pas considéré) et qui est en rapport avec le statut immunitaire des patients, aurait son influence, c'est en effet un des facteurs de risque pour l'infection par *K.p* (Colodner et al., 2004; White et al., 2004) et d'autres, s'accordent à dire que les plus touchés sont principalement les personnes âgées, les immunodéprimées, ainsi que les nourrissons et prématurés à faible poids (Van der Zwit et al., 1999; Ayan et al., 2003)

3. Distribution des profils en API 20^E

Le profil numérique 5215773 de *K.pneumoniae* est retrouvé 133 fois/170, soit une fréquence de 78.23%, c'est le profil par excellence de *K.pneumoniae*.

Le profil le moins fréquent est le 5205573 (uréase-, inositol-) pour 2.94% de cas, pour ce dernier les données de la littérature parlent de 7% (Decré et al., 2000).

Le profil 5205773, profil inhabituel chez *K.p* et qui concerne les souches dépourvues d'uréase est retrouvé avec une fréquence de 7.64%, contrairement aux résultats de Decré et al (2000) qui rapportent une fréquence plus élevée de 61,5%.

Les deux autres profils 5214773, 5215573 se succèdent avec 5.88% et 5.29%, respectivement.

Dans notre étude, les scores obtenus en identification biochimique par galeries API20E montrent une excellente identification, ce qui correspond à une probabilité d'identification comprise entre 99% et 98.78% et qui est retrouvée dans 17.77% des cas.

Une très bonne identification, ce qui correspond à une probabilité d'identification comprise entre 95% et 93% est retrouvée dans 14% des cas.

Une bonne identification, probabilité d'identification comprise entre 92% et 90% est retrouvée avec une fréquence de 59.33%.

Une faible discrimination est obtenue dans 8.88% des cas, en plus les souches concernées sont toutes uréase négative ce qui confirme également le caractère uréase négative chez *Klebsiella pneumoniae*.

3.1. API 20^E et site d'infection

Dans notre étude le profil caractéristique de la *K.pneumoniae* (5215773) est présent 48 fois/64 dans les prélèvements de pus divers, soit une fréquence de 75%, contre 26fois/48 pour les hémocultures, soit une fréquence de (54%), 12fois/20, soit 60% pour les urines. Il reste aussi prédominant dans les prélèvements de traitements invasifs 9 fois/12 (75%) pour les sondes vésicales.

3.2. API 20^E et service d'hospitalisation

Le profil 5215773 est prédominant parmi les externes (consultants) avec une fréquence de 75%. Il reste également prédominant dans les services. Les plus faibles fréquences concernent les profils 5205773 et 5205573.

4. Résistance et mécanismes de résistance aux antibiotiques de *K.pneumoniae*

4.1. Résistance de *K.pneumoniae* aux β -lactamines

Il est bien connu que les β -lactamines sont les antibiotiques de premier choix pour le traitement des infections à *K.p* aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (Ayan et al., 2003; Rebuck et al., 2000; Hussein et al., 2007).

Les résultats de notre étude montrent un taux de résistance naturelle à l'ampicilline, amoxicilline, 100% résistants et aux carboxypénicillines, 96.35% pour la ticarcilline. La résistance à l'association amoxicilline-ac.clavulanique, aux C1G, aux ureidopénicillines va de 43.35% pour l'AMC, résultat éloigné de celui de Farah et al en 2007, qui rapportent un taux de résistance de 52,4% pour l'AMC, phénomène lié à la production de β -lactamase type (TRI), 73% pour la cefazoline, à 81% pour la pipéracilline. Les inhibiteurs des β -lactamases associées aux β -lactamines, rétablissent l'action de ces antibiotiques (Li et al., 2004; White et al., 2004; Lavigne et al., 2004). Ainsi pour l'AMC on passe à 43.35% contre le 100% de la l'AMX, du à l'effet de l'acide clavulanique sur les β -lactamases chromosomiques (Murbach et al., 2001). Avec la TZP on passe à 9.61% contre 81% pour la PIP, et avec le TCC on passe à 59.41% contre 96.35% pour la TIC. Ce résultat est conforme à celui de Babingioia et al (2003) qui rapportent une baisse de résistance à la PIP quand elle est associée au tazobactam parmi une population de *K.p* BLSE+.

Des résistances croisées sont observées entre les pénicillines et les céphalosporines à large spectre ; en effet les isolats résistants à la tazopiperacilline étaient aussi résistants à la ceftazidime et au cefotaxime. Ces résultats concordent avec ceux de Rice et al (2000) et Friedland et al (2003) dans des études multicentriques aux USA, et ceux de Schumacher et al (2000) au Danemark qui indiquent des résistances croisées entre pénicillines et céphalosporines parmi les populations de *K.p* étudiées. La résistance à ces deux antibiotiques (ceftazidime et cefotaxime) est un marqueur important pour la détection de production des

BLSE (Medeiros, 2000; Midolo et al., 2002; Lavigne et al., 2004^a). Par ailleurs, Rice et al (2000) rapportent qu'une β -lactamase type SHV-1 ainsi que des protéines de la membrane externe seraient à l'origine d'un haut niveau de résistance pour la tazopiracilline et la ceftazidime à la fois. Bergogne-Bérézin (2002) indique que la résistance à la ceftazidime est en relation étroite avec son mode d'administration et les doses administrées.

Le tableau ci-dessous nous permet de comparer nos résultats avec des données mondiales.

Tableau 46: Taux de résistance au céfotaxime et à la ceftazidime dans des pays européens et africains

	France Sirot et <i>al</i> 2002	Turquie Ayan et <i>al</i> 2004	Grèce Galani et <i>al</i> 2002	Egypt El- Kholly et <i>al</i> 2002	Tunisie Boutiba et <i>al</i> 2002	Notre étude
Cefotaxime	10.1%	49.3%	83%	65%	75%	61,76
Ceftazidime	10.1	48.5	85%	60%	45%	41,15

Mise à part La France qui marque la plus basse résistance aux C3G, et la Grèce qui marque la plus forte résistance, nos résultats concordent avec ceux de nombreux pays de la Méditerranée.

En France et comme le montre une étude multicentrique sur trois années, une augmentation de sensibilité de *K.p* aux céphalosporines a été observée. Cette baisse de résistance est probablement une conséquence des mesures de contrôle épidémique instaurées dans les hôpitaux (Sirot et *al.*, 2002).

Les données de nombreuses études ont montré que l'exposition aux céphalosporines à large spectre est un facteur de risque pour l'émergence de la résistance à ces produits (Harbarth et al., 2001; Arlet et Phillipon, 2003). Ceci est particulièrement problématique, puisque le développement de la résistance aux C3G est associé avec l'augmentation de mortalité, de la durée d'hospitalisation, et l'augmentation des charges hospitalières (Astagenau et Lepoutre, 2002; Eckert et al., 2004; Bonnet, 2004; Bailly et al., 2004; Duck et al., 2004). Par ailleurs les souches résistantes aux C3G sont multirésistantes. Cette multirésistance fait que les cliniciens sont amenés, notamment dans les infections graves et plus particulièrement en réanimation, à utiliser des molécules de plus en plus puissantes, en particulier l'imipénème.

Sur l'ensemble des souches, la production de β -lactamase qui inactive principalement les aminopénicillines, les carbénicillines et les ureïdopénicillines, est le mécanisme de résistance le plus fréquent. La résistance au cefotaxime, à la ceftazidime, à l'aztréonam est associée à la

production de BLSE (Ayan et al., 2003; Farah et al., 2007). Les souches BLSE restent sensibles aux céphamycines.

L'imépénème reste la molécule la plus active, surtout vis-à-vis des *K.p* BLSE. Dans notre étude l'apparition de souches hospitalières avec des taux de résistance intermédiaire, nous interpelle à un suivi et un contrôle plus étroit de la résistance à cet antibiotique, puisque les carbapénèmes représentent la dernière ligne de défense dans l'armement antimicrobien contre les infections sérieuses ou invasives (Friedland et al 2003; Hussein et al., 2007; Dylan et al., 2009). Aujourd'hui, de nombreuses études montrent une rapide dissémination des *K.p* productrices de carbapénémases, spécialement en Israël (Hussein et al., 2007) et au nord des Etats Unis (Bratu et al., 2005; Dylan et al., 2009) où des épidémies à *K.pneumoniae* carbapénèmes résistantes (KPCR) sont enregistrées. Les KPCR sont isolées durant ou après l'admission dans une unité de soins intensifs dans 66% des cas, longs séjours avant l'isolement de la *K.p*, ventilation mécanique, port de catheter, et surtout traitement avec imipénème et vancomycine (Hussein et al., 2007).

L'activité des carbapénèmes peut-être compromise avec l'émergence de carbapénémases (Fernando et al., 2008), la KPC-1 et la KPC-2 carbapénémases qui peuvent être confondues avec une BLSE (Yigit et al., 2001; Moland et al., 2003). L'action de la KPC-1 se fait en association avec la réduction de l'expression des porines Omp K35 et Omp K37 (Yigit et al., 2001; Nordman et Poirel, 2002; Pasteran et al., 2008). Les enzymes de type KPC touchent toutes les carbapénèmes.

La littérature nous apprend que les Entérobactéries ne présentent pas de réservoir naturel de ces enzymes. La détermination des réservoirs, qui peuvent être environnementaux, pourraient aider à prévenir la dissémination des gènes carbapénémases et à prendre des précautions pour la pénétration dans un mécanisme moléculaire de la formation d'intégrons et de gènes cassette (Nordman et Poirel 2002).

4.2. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Les souches appartenant au phénotype sauvage, donc sensibles à tous les antibiotiques utilisés à l'exception des résistances naturelles (amoxicilline, ticarcilline) présentent la plus forte fréquence après les *K.p* BLSE+ qui marque la fréquence la plus élevée (62% contre 27%). Ces résultats sont très éloignés de ceux de France rapportés dans une étude multicentrique par Dutour et al (2002) qui rapportent une fréquence de 3% de *K.p* BLSE+ parmi les isolats de *K.p* étudiés. Une autre étude multicentrique aussi en France où sur 1061

souches de *K.p* seulement 1.23% étaient *K.p* BLSE+ (Ducki et Blech 2004). Courvalin et al., 2006 rapportent qu'à l'hôpital environ 70% des souches de *K.p* sont de phénotype sauvage ou sensible et qu'en pratique de ville cette fréquence concerne 76% de *K.p*.

Le phénotype de résistance pénicillinase haut niveau vient en troisième position, avec une fréquence de 18%, ce qui n'est pas très commun, parmi les *K.p*. En France par exemple, le réseau Aquitaine (2004) parle d'un taux de 0,9% seulement. Notre fréquence élevée est probablement due soit à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique de haut niveau, soit à une hyperproduction de la SHV-1 chromosomique, suite à une mutation du promoteur d'où une augmentation de l'expression du gène.

La fréquence de 3% est la prévalence du phénotype rare de résistance aux inhibiteurs des β -lactamases, ce qui reflète une évolution des β -lactamases de ces *K.pneumoniae*. Les enzymes en cause sont le plus souvent (90% des cas) des TRI (TEM résistants aux inhibiteurs) (Courvalin, 2006).

Notre étude indique cinq cas de résistance intermédiaire à l'imipénème. La résistance à l'imipénème est probablement liée soit à un phénomène d'imperméabilité associé à une modification des porines membranaires, soit à une production de carbapénèmases (Nordman et Poirel, 2002; Urban et al., 2004)

4.2.1. *K.pneumoniae* BLSE+ prévalence et répartition

Des bactéries productrices de BLSE ont été décrites pour la première fois dans les années 80 en Allemagne, en France c'est en 1985 que les premières BLSE ont été décrites. Le Maghreb est atteint vers 1989 (Benhassen et al., 1990). Dans les années qui ont suivi, la prévalence des BLSE n'a cessé de croître et même sur d'autres continents, de plus en plus de souches BLSE ont été isolées (Coudron et al., 1997; Winokur et al., 2001).

Les BLSE hydrolysent les C1G et les C2G sauf les céphamycines, ces dernières sont de bons marqueurs de la résistance, mais ne sont pas prescrites car elles sont inductrices et entraînent une résistance par imperméabilité.

Les BLSE peuvent atteindre les C3G et dès leur utilisation, les bactéries ont trouvé la parade.

Les infections causées par les *K.p* BLSE présentent un risque accru d'échec thérapeutique et sont associées à des hospitalisations prolongées et des surcoûts liés aux soins (Talon, 1999; Stone-Patricia et al., 2003; Rodriguez et Struelens, 2006). Les bactériémies causées par les souches *K.p* BLSE+ sont retrouvées associées à une mortalité plus élevée que

celle causées par des souches *K.p* non productrices de BLSE. Cette mortalité élevée est en partie due d'une part à la non détection de la production de la BLSE (Navon-Venezia S et al.; 2004; Bailly et al., 2004) et d'autre part, la présence de plasmides conjugatifs qui peuvent porter plus d'un gène codant pour ces BLSE, comme c'est le cas de l'épidémie à *K.p* BLSE+ au Brésil où des gènes codant pour les enzymes CTX-M et TEM ont été identifiés sur le même plasmide (De Rafeles et al., 2003). Ces données entraînent des mesures de surveillance, de contrôle et de détection rapide des BLSE (Navon-Venezia et al., 2004) pour empêcher la propagation de ce type de mécanisme de résistance.

La répartition géographique des *K.p* BLSE+ n'est pas homogène et la prévalence varie considérablement d'une région à une autre. Sahly et al (2004) rapportent que l'incidence des souches de *K.p* BLSE+ varie de 8% en Amérique du nord à 45% en Amérique Latine et 23% en Europe, avec une prévalence dominante aux USA, avec des taux allant de 9% au sud de l'Allemagne à 40% en France, 49% au Portugal et 59% en Turquie.

Dans les hôpitaux du sud de l'Europe, la prévalence au niveau des *Klebsiella* BLSE+ atteint les 25%, tandis que parmi les consultants externes elle est estimée à 4% (Zingg 2008). Aux USA une fréquence de 6% est enregistrée parmi les externes (Hesltine, 2000).

En Corée la prévalence de *K.p* BLSE est de 30% et les β -lactamases SHV-12 et CTX-M sont très communes (Kim et al., 2007). Dans certains pays, la prévalence approche 50%, avec des taux particulièrement élevés en Europe de l'Est et en Amérique latine (De Rafeles et al., 2003; Paterson et al., 2004). En Afrique, dans une étude multicentrique tunisienne regroupant 3 CHU, où 1110 souches pathogènes de *K.pneumoniae* ont été collectées, 75% présentaient une BLSE (Boutiba-Ben.Boubaker et al., 2002). De même dans une étude multicentrique au Caire (Egypte) regroupant 5 hôpitaux, sur 149 isolats de *K.pneumoniae* 65% étaient résistants au cefotaxime et 60% à la ceftazidime (El Kholly et al., 2002), ces deux antibiotiques sont les marqueurs principaux pour la production de BLSE (Villegas et al., 2004; De Silva et al., 2006; Valvedre et al., 2008). Au Nigeria la situation est plus dramatique puisque, 57% des souches *K.p* communautaires sont des CTX résistantes. (Keyenan et Rubinstein, 2007).

La situation est similaire en Israël, comme rapporté par Colodner et al dans une étude menée en 2004 sur 311 patients non hospitalisés (externes) avec infections communautaires du tractus urinaire: 128 souches BLSE+, et 183 souches BLSE-. En Italie dans une étude nationale 3,5% d'Entérobactéries communautaires étaient des BLSE+, avec 2,6% de *K.p*. La majorité des ces BLSE était de type TEM, mais une augmentation de CTX a été notée en l'occurrence (Luzzaro et al., 2006).

Dans une étude prospective de 455 épisodes consécutifs de bactériémies à *K.p* dans 12 hôpitaux de 7 pays, 85 épisodes étaient dus à un organisme producteur de BLSE (Paterson et al., 2004). L'échec de l'utilisation d'un antibiotique actif contre *K.p* BLSE+ était associé avec une mortalité élevée. C'est le cas des hôpitaux en Israël où pour plus de 600 patients porteurs de *K.p* BLSE+ la morbidité avoisine les 40% et la mortalité est de 25%. Cette sévère épidémie avec un lourd fardeau économique a suscité une révision épidémiologique des infrastructures des hôpitaux Israéliens (Paterson et al., 2004). En revanche une étude multicentrique internationale de bactériémies dues à des *K.p* BLSE+ montre que la mortalité était significativement réduite suite à l'utilisation de carbapénèmes durant les cinq premiers jours (Rahal, 2000).

Au CHU de Constantine, en 2002, sur 350 *K.p* hospitalières, 67.3% sont des *K.p* BLSE, en 2004 la fréquence diminue légèrement pour atteindre 65%. Entre 2005-2006 le taux des *K.p* BLSE +diminue à 56% (Résultats du réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques) ces chiffres restent considérables.

Au niveau national, le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des bactéries aux antibiotiques, indique une incidence de 40.2% de *K.p* BLSE+, ce résultat un peu éloigné des résultats de notre étude (62%) et nous informe néanmoins sur la situation nationale globale en matière de résistance dans nos hôpitaux, qui est très préoccupante. La situation dans les hôpitaux nationaux ciblés ne semble pas maîtrisée.

Notre étude montre que le sexe est un facteur de risque pour l'infection par *K.p* BLSE+, en effet sur les 105 isolats *K.p* BLSE+, 42 proviennent de patients de sexe féminin et 63 de patients de sexe masculin, 40% contre 60%. Ces résultats concordent avec ceux de Colodner et al 2004 qui rapportent qu'il y'a augmentation significative chez le sexe masculin : 13.7% dans le groupe *K.p* BLSE négative à 35.9% dans le groupe *K.p* BLSE+, ce même auteur ajoute aussi, être âgé de plus de 60 ans, être diabétique, et avoir pris des antibiotiques à large spectre constituent d'autres facteurs de risque pour l'infection par des *K.p* BLSE+. Ces facteurs de risque sont également rapportés par Lautenbach et al., 2001; Tumbarello et al., 2006).

Notre étude de la répartition des *K.p* BLSE+ en fonction des services nous indique que le service de réanimation constitue le carrefour idéal pour ces *K.p* BLSE+ avec une fréquence de (70%), suivi de la chirurgie avec 65% et de la médecine interne avec une fréquence de (62%). Ces résultats sont éloignés de ceux de France (40%) et du Portugal (49%) et de Turquie (59%) et encore plus de ceux d'Allemagne (9%) au niveau des services de réanimation, selon Lavigne et al (2004).

La distribution des *K.p* BLSE+ en fonction des prélèvements montre une augmentation significative dans les prélèvements de pus divers (55.23%), et les hémocultures (30,5%) parmi les 105 *K.p* BLSE+. Ces résultats concordent avec ceux de (Friedland, 2003 ; Paterson, 2004; Tambarello, 2006) qui rapportent que les *K.p* BLSE+ sont majoritaires dans les pus et les hémocultures.

Enfin n'oublions pas que la production des *K.p* BLSE+ est souvent associée à la résistance à d'autres antibiotiques, essentiellement aux aminosides, à l'acide nalidixique et au co-trimoxazole, antibiotiques bactéricides très utilisés. Nos résultats sont en partie en accord avec ceux de (Resetarova et al., 2007) qui rapportent que 87.2% des isolats *K.p* BLSE+ sont résistants à plus de 20 antibiotiques parmi 37 testés, et 93.6% sont simultanément résistants aux aminoglycosides et fluoroquinolones, selon une étude menée dans un hôpital universitaire en République Slovaque. Par ailleurs, beaucoup d'auteurs s'accordent à dire que l'amikacine et l'imipénème sont les seuls antibiotiques actifs sur les *K.p* BLSE+.

Parmi les nouvelles β -lactamases à spectre élargi (BLSE) médiatrices de la résistance vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération C3G, il convient de citer en premier lieu, le groupe CTX-M, puis les β -lactamases de type BES, GES, PLA, PER, VEB.

Les CTX-M constituent une nouvelle famille d'enzymes de la classe A d'Ambler (groupe 2be de Bush) qui s'est vite élargie, et propagée à travers le monde (Lartigue et al., 2003; Gangoue-Pieboji et al., 2005; Moubarek et al., 2005; Livermore et al., 2007; Valverde et al., 2008) à cause d'un manque de détection dans beaucoup de laboratoires (Navon-Venezia et al., 2004; Villegas et al., 2004).

Le groupe CTX-M (pour céfotaximase) conférait à l'origine, chez les Entérobactéries, un plus grand niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone) céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime (Brenwald, 2004; Hernandez et al., 2005; Phillipon et Arlet, 2006), Certaines d'entre elles ont évolué récemment par mutation ponctuelle ou non, générant un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19 ou encore CTX-M-32 dérivant par simple mutation (Asp240Gly) de CTX-M-1 (Bush, 2001; Navarro et Miro, 2002; Cartelle et al 2004).

Les *K.p* BLSE+ du CHU de Constantine présentent des CMI élevées pour le cefotaxime.

Dans notre étude les résultats des CMI ainsi que le séquençage par PCR (Effectué pour nous par le laboratoire de bactériologie et de virologie du Pr Thierry Naas à Paris) nous indique une dissémination de BLSE type CTX-M-3. Ce résultat concorde avec celui de Baraniak et al (2002) qui rapporte une dissémination prédominante de BLSE CTX-M-3 parmi

les Entérobactéries en Pologne. Par contre Chanawong et al en 2002 également, parlent d'une dissémination de CTX-M-9, 13 et 14 parmi les Entérobactéries en Chine.

La gravité de ces *Klebsiella* résistantes aux C3G est d'autant plus alarmante qu'actuellement elles ne sont plus cantonnées à l'hôpital, mais sont aussi responsables d'infections communautaires. En 2007, plus de 30% des souches isolées en ambulatoire étaient résistantes aux C3G dans une étude multicentrique en Tunisie (Boutiba et al., 2007).

Les transferts horizontaux et verticaux sont responsables de la large diffusion de ces CTX-M-3 parmi les *K.p* BLSE. En revanche pour l'ensemble des souches testées, et d'après, les résultats de l'ECP, la diffusion n'est pas clonale. Ces résultats concordent avec ceux de Pimkin et al (2002) sur des souches de *K.p* BLSE+ type CTX-M-3 en Russie, dont l'émergence n'est pas clonale également. Aux Etats-Unis, Lewis et al (2007) rapportent une émergence prédominante de BLSE type CTX-M.

Une étude faite sur des souches de Salmonelles isolées au CHU Benbadis durant l'année 2004, montre la présence de BLSE type CTX-M-3 (Naas et al., 2008); il s'agit donc dans le cas de *K.p* d'une épidémie de plasmide.

4.3. Résistance de *K. pneumoniae* aux aminosides

Dans notre étude *K.p* a une sensibilité diminuée vis-à-vis des aminosides, 69.23% d'isolats résistants à la gentamicine, 48.07% à l'amikacine. Ce taux de résistance est d'autant plus inquiétant, puisque l'amikacine est considérée comme un aminoside de premier choix dans le traitement des infections nosocomiales à *K.p* et surtout à *K.p* BLSE+ (Schelenz et al., 2007). Nos résultats montrent des résistances croisées entre la gentamicine et l'amikacine et entre gentamicine et tobramicine. La résistance aux aminosides est associée à la résistance acquise aux β -lactamines et au co-trimoxazole. 81% des souches résistantes à la gentamicine et à l'amikacine étaient aussi résistantes l'amoxicilline+ac.Clav et aux C3G. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par de nombreux auteurs qui indiquent que la résistance aux aminosides est souvent associée à la résistance aux β -lactamines, résistances médiées par le même plasmide (Winokur et al 2000 ; Bergogne-Berézin 2000 ; Quentin et al., 2004). En Europe la surveillance de la résistance aux aminosides indique des chiffres plus faibles que les nôtres, 23.5% à la gentamicine en Angleterre, (Shannon et French, 2004), 30% en Grèce (Galani et al, 2002) ; les données Egyptiennes se rapprochent des nôtres avec 42% de résistance à la gentamicine et 47% pour l'amikacine (El-Khory et al., 2002).

Il existe une corrélation significative entre l'apparition de mutants résistants et surtout des résistances plasmidiques et l'usage des aminosides (Harbarth et al., 1998; Zwet et al., 1999; Lambert et Courvalin, 2000; Quentin et al., 2004).

4.4. Mécanisme de résistance aux aminosides

Dans notre travail, les phénotypes sont définis à l'aide de six aminosides : Kanamycine, tobramycine, netilmycine, gentamicine, amikacine et isépamycine. Cela nous a permis de distinguer un phénotype sauvage (sensible à tous les aminosides) ainsi que les phénotypes de résistance. Les mécanismes de résistance les plus incriminés sont probablement

- La modification enzymatique : la résistance aux aminosides est due principalement à des enzymes modificateurs plasmidiques ou à des transposons codant pour des enzymes modificateurs qui confèrent les phénotypes : G, GT, GTNt, TNtA, et GTNtA. Trois classes d'enzymes sont synthétisées de manière constitutive et affectent la fixation de l'antibiotique sur l'ARN 16S (Lambert, 2007).

Dans notre étude, le mécanisme de résistance impliquant l'enzyme AAC (3)-II (KTGNt) est le plus fréquent, il représente 41% des mécanismes de résistance. Ce résultat est en accord avec les rapports de la littérature (Schannon et French, 2004; Keynan et Rubinstein 2007) indiquant une prédominance de ce phénotype de résistance chez *K.p* et principalement chez *K.p* BLSE+. Le phénotype par inactivation de l'enzyme ANT (2'')-I (KTG) a une fréquence de 13.22%, le phénotype association d'enzymes ou imperméabilité le KTGANt avec une fréquence de 10%. Le KTANt impliquant l'enzyme AAC (6')-I a une fréquence de 6.43%.

Le phénotype G retrouvé dans 2.35% des souches, implique l'enzyme AAC (3)-I.

La combinaison AAC (6')-I + AAC (3)-I induisant une résistance à tous les aminosides est établie pour *K.pneumoniae* (Galani et al., 2002).

Les phénotypes relevant d'un mécanisme d'imperméabilité ou d'association de plusieurs enzymes représentent 0.33% en France (Lavigne et al., 2004).

4.5. Résistance aux quinolones

Dans notre étude les quinolones et les fluoroquinolones conservent une bonne activité, vis-à-vis de *K.p*. L'ac-nalidixique marque une fréquence de 28,84 éloignée de celle de la Tunisie à 19.8% (Boutiba-Benboubaker et al., 2002), mais qui se rapproche de celle de France à 23.2% (Sirot et al., 2002). En revanche pour les fluoroquinolones (ciprofloxacine et

ofloxacin), nos isolats restent des plus sensibles avec les taux complets, 100% de sensibilité. A titre de comparaison le tableau ci-dessous nous indique les fréquences de sensibilité dans quelques pays.

Tableau 47: Taux de sensibilité à la Ciprofloxacin et l'Ofloxacin dans des pays européens et africains.

	France Sirot et al 2002	Angleterre Shannon et al 2003	Russie Winokur et al 2000	Tunisie Boutiba et al 2002	Etats- Unis Wang et al 2004	Notre étude
Ciprofloxacin	88%	83%	97%	88	88.9	100
Ofloxacin	84%	82%	93%	93.6	86.6	100

D'une façon générale, et malgré une régression de sensibilité vis-à-vis des fluoroquinolones dans beaucoup de pays, les fluoroquinolones représentent une excellente alternative pour le traitement des infections à *K.p* (Hooper et al., 2000). D'un point de vue moléculaire la résistance aux quinolones est communément acquise à travers des mutations chromosomiques plutôt que par échanges de plasmides (Winokur et al., 2000; Wang et al., 2004). Ces déterminants chromosomiques sont donc stables et non transférables, et ne sont pas associés physiquement à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Nordman, 2006). Dans la majorité des cas, le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones résulte d'une mutation chromosomique dans les gènes *gyr A* et *par C* ou changement dans la perméabilité ou efflux, ce qui reflète la pression de sélection dans l'environnement clinique (Hooper, 2001; Robert et al., 2001).

Les études récentes indiquent que la résistance aux quinolones peut aussi être transférée par des plasmides porteurs de gène responsable *qnr* (Quinolone Resistance) (Nordman et Poirel, 2007). Cette résistance plasmidique a été découverte pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *K.pneumoniae* hébergeant un plasmide codant pour une protéine QnrA, protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones (Martinez-Martinez et al, 1998). Cette résistance plasmidique est donc facilement transférable, et est associée à la résistance à d'autres familles d'antibiotiques

(Martinez-Martinez et al., 1998; Martinez-Rodriguez et al 2003; Mammeri et al., 2005).

Notre étude montre une évolution de la résistance entre 2002 et 2004 pour l'acide nalidixique. Nos résultats indiquent que la résistance à l'acide nalidixique était fréquemment associée à la résistance acquise aux β -lactamines, aux aminosides et co-trimoxazole. Ainsi 60% des souches résistantes à l'ac-nalidixique avaient un modèle de résistance acquise aux β -lactamines en comparaison avec les souches sensibles. Ces résultats sont similaires à ceux de Wang et al (2004) sur des isolats aux USA où une haute fréquence de résistance aux quinolones est notée pour les isolats *K.p* BLSE+ (18% contre 56%). Tolun et al (2004) retrouvent également cette association aussi bien chez des isolats de *K.p* que chez *E. coli*.

La résistance à l'ac-nalidixique était aussi associée avec la résistance à la gentamicine (30% de souches résistantes à l'ac-nalidixique, comparée à 4% seulement des souches sensibles à l'ac-nalidixique). Pour le co-trimoxazole une résistance associée dans 81% de souches résistantes à l'ac-nalidixique, comparée à 30% aux souches sensibles à l'ac-nalidixique. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Robert et al., 2001) qui rapportent que 8% des souches résistantes à l'ac-nalidixique étaient également résistantes aux β -lactamines, 29% étaient résistantes à la gentamicine et 95% au co-trimoxazole.

Cette résistance combinée peut résulter d'une baisse de perméabilité de la paroi cellulaire, ou d'un mécanisme d'efflux actif, (association de trois protéines membranaires qui entraînent l'éjection de l'antibiotique), impliquant une résistance non sélective vis-à-vis de plusieurs antibiotiques (Robert et al., 2001). Par ailleurs un traitement antérieur par fluoroquinolones est un facteur de risque significatif pour la résistance à ces molécules en cas d'un second traitement (Tigaud, 2000; Stahl et al., 2004).

4.6. Mécanisme de résistance aux quinolones

Notre étude montre que pour les *K.p* du CHU de Constantine et durant la période considérée, deux phénotypes de résistance seulement sont enregistrés, le phénotype I ou sauvage et le phénotype II (phénotype de résistance aux quinolones de première génération, à savoir l'ac-nalidixique). Le phénotype sauvage est le prédominant avec une fréquence de 65.38%, et le phénotype II a une fréquence de 34.61%. Les autres phénotypes, ne sont pas représentés puisque nos souches *K.p* sont très sensibles à l'ofloxacin et à la ciprofloxacine. Ces phénotypes de résistance relèvent de mécanismes différents, il s'agit en général de mutations spontanées dans certains gènes chromosomiques qui réduisent la sensibilité de la bactérie (Jacoby et al., 2003). Deux grands mécanismes: diminution d'affinité des cibles intracellulaires que sont les complexes ADN-ADN gyrase et ADN-ADN topoisomérase IV, et

diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique, par défaut de pénétration passive et/ ou excrétion active (Ho et al., 2001; Hooper, 2001; Yamane et al., 2007)..

La résistance aux quinolones peut aussi être transférée par des plasmides porteurs de gène responsable, *qnr* (Quinolone Resistance) qui sont recherchés par des techniques de biologie moléculaire (Wang et al., 2004^b; Nasic et al., 2005)

Deux autres mécanismes de résistance plasmidique ont été rapportés récemment: inactivation des quinolones par l'acetyltransférase AAC(6')-Ib-cr (Robicsek et al., 2006) et dernièrement, excrétion active des fluoroquinolones via la pompe d'efflux QepA (Périchon et al., 2007).

La résistance plasmidique en milieu hospitalier est redoutable car elle est infectieuse.

Plusieurs études ont démontré la prévalence du gène *qnr A* et ont montré que ce gène est présent dans tous les continents chez les entérobactéries multi résistantes aux antibiotiques et en particulier aux céphalosporines de troisième génération par production de BLSE ou de céphalosporine plasmidique. Cette prévalence varie de 0.5% en France chez les entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique à 48% chez les entérobactéries BLSE en Thaïlande (Robicsek et al., 2006).

Le gène *qnr* a été retrouvé en Algérie chez des entérobactéries (Labadene et al., 2008).

L'émergence de ces nouveaux mécanismes de résistance plasmidique constitue une vraie menace concernant l'efficacité des fluoroquinolones et ce à deux niveaux:

D'abord leur présence dans des plasmides conjugatifs favorise leur mobilité et leur dissémination chez les différents pathogènes. De plus leur association à d'autres déterminants de résistance essentiellement, β -lactamines et aminosides, concourt à une co-sélection de la résistance aux fluoroquinolones par ces derniers antibiotiques largement utilisés en thérapeutiques humaines. Ces trois mécanismes de résistance plasmidique confèrent un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones, mais leur présence pourrait potentiellement favoriser l'évolution vers un plus haut niveau de résistance par la sélection de mutation dans les cibles, topoisomérases II.

Par ailleurs, il n'existe pas de critères phénotypiques sur un antibiogramme permettant de distinguer les mécanismes de résistances chromosomiques et plasmidiques aux quinolones. La détection repose donc sur des techniques de biologie moléculaire (Nordman et Mammeri, 2007).

4.7. Résistance au Sulfaméthaxazole:

Pour l'association sulfamides-triméthoprimine, les mécanismes de résistance sont nombreux mais le principal est le support plasmidique.

Pour les sulfamides 3 gènes de résistance (Sul I, Sul II, Sul III) codent pour l'enzyme DHPS, la dihydroptéroate-synthétase, conférant une grande résistance (Golstein, 2007).

Près de 65% de nos souches sont résistantes à cet antibiotique. Au niveau national le réseau de surveillance de 2009 rapporte un taux de 54,21% (61,3% hospitalières et 38,52% externes)

5. Variation interservices de la résistance

Notre étude montre que dans la plupart des services la résistance (I+R) dépasse les 50% pour la majorité des antibiotiques. Mais certains services sont de plus grands pourvoyeurs de souches multi résistantes, et c'est en particulier le cas du service de réanimation et de chirurgie. Ceci est la conséquence d'une utilisation abusive des antibiotiques, et qui incite à améliorer encore et toujours les mesures d'hygiène.

Pour les C3G le pourcentage de résistance le plus élevé est enregistré en chirurgie (66,66%), ce résultat ne concorde pas avec celui de Sirot et al (2001) qui enregistre le taux le plus élevé en médecine 42.1% contre 19.9% en chirurgie. De même pour les travaux en Tunisie de Boutiba et al (2002) qui rapportent que la plus forte résistance aux C3G est en Pédiatrie.

Pour les aminosides et les sulfamides et plus particulièrement l'amikacine, la gentamicine, et le co-trimoxazole, les taux les plus élevés sont notés en réanimation 69.44% et 75%, 69.44% respectivement. Ce résultat est similaire à celui de Quentin et al (2004) et Galani et al (2002) en Grèce qui indiquent que le service de réanimation marque la plus forte résistance aux aminosides. Les fluoroquinolones restent très actifs au niveau du CHU de Constantine, contrairement aux résultats, d'une étude à Ain M'lila sur les infections urinaires, où l'on assiste à une régression de sensibilité vis à vis des fluoroquinoloés (15.8% de résistance vis-à-vis de l'ofloxacin) (Bouzenoune et al., 2009).

D'une façon générale la résistance de la *K.p* aux antibiotiques rejoint celle des bacilles à Gram- (BGN) dans les services de réanimation où la résistance aux antibiotiques est la résultante de deux phénomènes complémentaires :

- La fréquence des espèces en général des BGN dont le support de base ou résistance naturelle est très différente selon l'espèce.

- La fréquence de la résistance acquise au sein de chacune des espèces due à la pression de sélection par les antibiotiques à large spectre (C3G) (Friedland et al., 2003).

Le retour à une situation plus normale serait en particulier, le respect des consignes de lavage des mains, la désinfection des locaux, une politique de l'antibioprophylaxie et de l'antibiothérapie ainsi que la détection rapide des porteurs des bactéries multi résistantes (BMR) (Bergogne-Bérézin, 2000; Bucholz et al., 2001; Stewart et al., 2001).

6. Variation de la résistance en fonction du prélèvement

Notre étude montre que les plus hautes fréquences de résistance sont notées dans hémocultures, plutôt que dans les urines, comme pour la majorité des données de la littérature (Winokur et al., 2000 ; Robert et al., 2001 ; Riegel, 2002 ; Lavigne et al., 2004). En revanche nos résultats concordent avec les résultats nationaux de Bouzenoune et al (2009) qui rapportent que les fréquences les élevées sont aussi observées dans les hémocultures. Les prélèvements de pus divers viennent en deuxième position, avec des taux qui se rapprochent de ceux enregistrés dans les urines, avec quelques disparités.

Le CHU où se déroule notre étude n'a pas de service d'urologie ce qui peut expliquer la fréquence plus importante de bactériémie à *K.p* multi résistante que d'urines.

7. Electrophorèse en champ pulsé

Les infections nosocomiales sont responsables d'une importante morbidité, de plus les facteurs favorisant ces infections sont multiples. La connaissance précise des souches bactériennes isolées lors d'une recrudescence d'infections dans une unité hospitalière, au-delà de l'identification de l'espèce et de l'antibiogramme de routine, est devenue une nécessité pour repérer le mode de transmission de la bactérie à l'hôte. Les caractères phénotypiques usuels ont leurs limites. Si un certain nombre de caractères phénotypiques permettent de définir une espèce bactérienne, l'expression des caractères phénotypiques peut varier selon les conditions de vie de la bactérie.

La bactérie qui semble constamment ressentir son environnement, active ou inhibe certains de ses gènes de manière à être en harmonie avec celui-ci. Il se pose donc un problème de la reproductibilité des résultats, pouvant être gênant pour les comparaisons d'une série de souches, si l'on se base sur des caractères phénotypiques.

L'intégrité de l'ADN n'étant pas atteinte lors des modifications de vie, l'ECP ne rencontre pas ces problèmes de reproductibilité des résultats. De plus, une variabilité génétique est pratiquement toujours constatée au sein d'une même espèce et l'ECP permet de différencier ces souches.

Les pulsotypes, profils générés par l'ECP, présentent un nombre relativement restreint de bandes du fait de l'utilisation d'enzymes coupant en des sites plus rares que les enzymes courants. Le choix de l'enzyme dépend du contenu G+C de l'ADN bactérien et de la séquence de reconnaissance de l'enzyme. Pour *Klebsiella*, l'enzyme de restriction utilisée est soit *SpeI*, soit *XbaI* qui permet d'obtenir les profils les plus discriminants. Pour notre étude c'est la *SpeI* qui a été utilisée.

La reproductibilité de l'ECP est contrôlée par l'introduction de souches de pulsotypes connus à chaque manipulation.

Les méthodes de typage moléculaires, en particulier l'ECP, qui est considérée comme l'étalon-or des méthodes de typage moléculaire (Singleton, 2005), ont amené un nouveau pouvoir discriminant des souches bactériennes entre elles, souches pouvant être indifférenciables par des méthodes phénotypiques ou sérologiques classiques (Foissaud et al., 1998).

C'est ainsi que pour la *K.p* du CHU de Constantine, et durant la période d'étude étalée de 2002 à 2004, concernant 170 souches, la biotypie ne nous a différencié que 5 biotypes, et l'antibiotypie seulement 5 antibiotypes aussi. L'ECP quant à elle, permet une plus grande

discrimination de ces souches, ainsi on retrouve 4 clones distincts regroupant 24 souches, chaque clone comprend des souches qui sont liées épidémiologiquement. Les 28 souches restantes, ont chacune un pulsotype différent et sont donc sans liaison épidémiologique.

Ces résultats révèlent bien le polymorphisme des souches, qui n'est pas aussi apparent avec les deux méthodes phénotypiques.

L'existence de souches de génotypes différents exclut la dissémination d'une seule souche épidémique dans l'hôpital.

Par ailleurs le fait de retrouver dans le même clone des souches de 2003 et de 2004 nous indique que la situation est ancienne et qu'elle persiste, principalement en réanimation et en médecine.

Beaucoup d'enquêtes menées en milieux hospitaliers ont montré que le génie épidémique de *K.p* est limité. Il est habituel que dans un même service plusieurs variétés de *K.p* coexistent. L'existence de flambée épidémique à *K.p* est exclue, celle de petits foyers est possible.

Conclusion

Conclusion

Les résultats de cette étude permettent de fournir des données épidémiologiques sur *K.p* au niveau de l'hôpital Benbadis ainsi qu'une évaluation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques des 3 principales familles. Ce type d'étude d'incidence représente un des éléments épidémiologiques qui peut être intégré dans un programme plus global de lutte contre les infections nosocomiales.

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste découvert depuis plus d'une centaine d'années. Aujourd'hui elle est le chef de file des germes responsable d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques. Les premières souches productrices de BLSE appartenaient à l'espèce *K.p*. Leur fréquence a augmenté chez cette espèce de 1% à 10%-25% entre 1985 et 1991, pour diminuer ensuite et se situer autour de 5 à 10% en France.REF Nos chiffres sont beaucoup plus élevés quant à la fréquence des *K.p* BLSE+ et les taux de résistance aux β -lactamines et aux aminosides. Au CHU de Constantine, en 2002, sur 350 *K.p* hospitalières, 67.3% sont des *K.p* BLSE, en 2004 la fréquence diminue légèrement pour atteindre 65%. Entre 2005-2006 le taux des *K.p* BLSE +diminue à 56% (Résultats du réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques) ces chiffres restent considérables.

La population des souches *K.p* BLSE+ est prédominante dans les prélèvements de pus divers et les hémocultures. En revanche la population de ces *K.p* BLSE +varie d'un service à l'autre. Le service de réanimation constitue le carrefour idéal pour la persistance et l'amplification des nouvelles bactéries multi-résistantes, dont la lutte doit devenir une priorité. L'analyse des résultats de l'épidémiologie moléculaire montre une diversité clonale très importante parmi les souches cliniques de *K.pneumoniae*. La dissémination de la résistance aux antibiotiques n'est pas due à la transmission clonale de souches résistantes, en revanche, la pression de sélection exercée par les antibiotiques (β -lactamines et aminosides, et quinolones) favorise cette évolution. La promotion d'alternatives thérapeutiques et un usage raisonné des antibiotiques sont probablement indispensables pour contrôler la diffusion de la résistance chez les souches de *K.pneumoniae*.

La résistance change d'un pays à l'autre, bien que l'émergence se développe rapidement localement puisque les bactéries sont exposées aux mêmes antibiotiques et soumis aux mêmes conditions. Le renforcement des mesures d'hygiène, l'isolement des patients porteurs des BLSE,

le dépistage des porteurs à l'admission, et les rapports de laboratoire des patients doivent indiquer que l'on soupçonne ou qu'on a établi la présence d'un isolat producteur de BLSE. Le signalement de souches BLSE sur les résultats de laboratoire est importante sachant qu'un échec thérapeutique est possible chez les patients recevant des pénicillines, la ceftazidime, le cefotaxime, le ceftriaxone et l'aztréonam, ces informations permettent d'éviter l'extension des épidémies (Patersson DL 2000)

- Ū Sur le plan thérapeutique, la monothérapie est suffisante en l'absence de signe de gravité clinique et dès lors que la responsabilité de tel ou tel pathogène peut-être raisonnablement suspectée.

Les associations d'antibiotiques sont réservées aux patients graves. (Dawis et al., 2003)

- Ū En pratique, il faut combiner 3 méthodes pour une discrimination optimale des souches bactériennes entre elles. Afin d'obtenir une information épidémiologique de qualité, l'identification est systématiquement accompagnée d'un antibiogramme, ces deux méthodes phénotypiques sont complétées par une étude de biologie moléculaire en occurrence une ECP. Cette méthode est la plus discriminante et elle est excellente pour le typage d'épidémie avec un petit nombre d'isolats, car en cas d'un nombre élevé d'isolats la stratégie la plus convenable serait de faire en premier lieu le sérotypage K ou O suivi de l'ECP pour les isolats probablement identiques. (Hansen et al 2002).
- Ū En ce qui concerne les *K.pneumoniae* du CHU de Constantine, elles sont multi résistantes et hyperproductrices de BLSE. Le caractère communautaire ou nosocomial de la souche influence énormément le niveau de résistance et la résistance aux β -lactamines et est associée de façon significative à celle des aminosides et à celle de l'ac-nalidixique. Bien que durant la période d'étude toutes les souches recueillies sont à 100% sensibles aux fluoroquinolones testés, des études récentes dans le même centre d'étude, montrent une évolution vers la résistance pour les fluoroquinolones, ce qui constitue une vraie menace concernant l'efficacité des fluoroquinolones et ce à deux niveaux. D'abord la présence des mécanismes de résistance sur des plasmides conjugatifs favorise leur mobilité et leur dissémination. De plus leur association à d'autres déterminants de résistance essentiellement β -lactamines et aminosides concourt à une co-sélection de la résistance aux fluoroquinolones par ces derniers antibiotiques largement utilisés en thérapeutique humaine. D'autre part et bien que la prévalence de la résistance aux carbapénèmes est encore très faible il convient de rechercher la faible résistance par des CMI et par la recherche de carbapénémases.

L'ECP reste de loin le marqueur épidémiologique le plus discriminant et nous permet de conclure que durant la période considérée, les *K.pneumoniae* recueillies, ne proviennent pas du même clone puisqu'elles présentent des pulsotypes différents, ce qui exclut la dissémination clonale d'une seule souche épidémique au niveau de l'hôpital. La situation relève plutôt d'une implantation de petits foyers épidémiques dans nos services à haut risque infectieux.

Ü L'analyse des résultats des quatre méthodes (biotypie, antibiotypie, pulsotypie et AFD), nous révèlent bien que nos résultats ne sont pas superposables, ce qui est probablement dû au fait, que les gènes de résistance sont portés essentiellement par des plasmides, ce qui leur confère un potentiel de propagation rapide entre les différentes souches.

La résistance bactérienne est générée par l'homme, par un mauvais usage des antibiotiques prescrits soit inutilement, soit incorrectement. Les bactéries multi résistantes se transmettent ensuite en faveur d'un manque d'hygiène. Nous rappelons les objectifs prioritaires pour la structure de soins qui sont des mesures d'hygiène strictes, une politique de l'usage antibiotique et l'apport d'information régulière sur l'épidémiologie des souches et des résistances dans les services.

PERSPECTIVES

Perspectives

Cette étude nous a permis d'être initiés à l'étude des antibiotiques in vitro, ce qui constitue une base scientifique nous permettant d'initier des travaux sur l'activité antibactérienne des plantes par exemple. De plus notre expérience en épidémiologie moléculaire permettra à notre équipe d'être présente au sein de groupes de travail pluridisciplinaires Biologie- Clinique- Epidémiologie.

Différents mécanismes de résistance ont été décrits dont le plus fréquent est celui de la production de β -lactamases et comme indiqué dans la littérature, ce phénomène échappe souvent à la détection dans les laboratoires de routine, où les techniques conventionnelles "manuelles" sont souvent sources d'erreurs, il est temps peut-être d'automatiser nos laboratoires, et l'idéal serait d'aller puiser directement dans le génome grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire, qui devraient être introduites dans nos laboratoires: c'est le meilleur garant d'un diagnostic fiable, rapide, pour des mesures préventives comme l'isolement du malade et le renforcement des mesures d'hygiène.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abott S.** 1999. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter and Serratia*. Manuel of Clinical Microbiology, 7th edn. Washington DC: 475-82.
2. **Alobwed I, M'Zali F.H, Livermore D.M, Heritage J, Todd N, Hawkey P.M.** 2003. CTX-M extended-spectrum β -lactamase arrives in hte UK. *J Emerging Infectious Diseases* **7**: 178-82.
3. **Andersson M.L, MacGowan A.P.** 2003. Development of the quinolones. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **51** S1: 1-11
4. **Andrews J.** 2003. Detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in *E.coli* and *Klebsiella* species. [Online] <http://www.bsac.Org.uk/uploads/Ecoliklebsiella.pdf>.
5. **API 20^E.** 1999. Catalogue Analytique, Analytical Profile Index. Bio Mérieux S A.
6. **Argumentaire de l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.** 2002. *Méd et Mal Inf* **32**: 134-58.
7. **Arlet G, Philippon A.** 2003. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Franç Lab*; **352**: 41-55.
8. **Armengaud A.** 2003. rôle du clinicien dans la détection d'une épidémie. *J Médecine et maladies infectieuses* **33** (Suppl A) 4-9
9. **Astagneau P, Fleury L, Leroy S, Lucet J-C, Golliot F, Régnier B, Brücker G.**1999. Cost of antimicrobiol treatment for nosocomial infections based on French prevalence. *J of Hospital Infection* **42**:303-312
10. **Astagneau P, Lepoutre A.** 2002. La mortalité attribuable aux infections hospitalières. *Adsp* **38**: 27-9.
11. **Avril J.L, Donnio P.Y.** 1998. Les marqueurs épidémiologiques bactériens. In *Les infections nosocomiales et leur prévention* **8** : 110-117 Coordonnateurs Jean-Loup Avril et Jean Carlet. Ellipses/ ed Marketing SA.
12. **Ayan M, Kuzucu C, Durmaz R, Aktas E, Cizmeci Z.**2003. Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. *J Infect Control Hosp Epidemiol* **24**: 495-500.
13. **Babini Gioia S, Yuan M, Hall L and Livermore D.M.**2003.Variable susceptibility to piperacillin/tazobactam amongst *Klebsiella ssp.*With extended-spectrum β -lactamase. *j antimicrobiol chemotherapy* **51**: 605-612.

14. **Baerwolf S, Geffers C, Behnke M.** 2002. Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. *SHEA* 216.
15. **Bailly P, Gbaguidi Haore H, Crenn D, Talon D.** 2004. Mortalité hospitalière imputable aux infections nosocomiales: mise en place d'un observatoire dans un centre hospitalier universitaire. *J Médecine et maladies infectieuses* **34**: 76-82.
16. **Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz w.** 2002. Countrywide spread of CTX-M-3 extended spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **46**: 151-9.
17. **Barlow M, Hall B.G.** 2003. Origin and evolution of the AmpC beta-lactamase of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 1190-1198
18. **Barlow M, Hall B.G.** 2004. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol* **55**:314-321
19. **Barnaud G, Phillipon A, Arlet G.** 2004. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **48**: 1249-1255.
20. **Barouton G, Carniel E, Guiso N, Postic D and Saint Girous J.** 1995. Méthodes de typage moléculaire des bactéries: Application à l'épidémiologie. *Méd Mal Inf* **25**(Spec) 1240-1242.
21. **Bentchouala C.** 2009. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques des Salmonelles Mineures. Thèse de Doctotat en Sciences Médicales. 77-78.
22. **Bergogne-Bérézin E, Dellamonica P.** 1995. Antibiothérapie en pratique clinique. Masson, Paris. P 486
23. **Bergogne-Bérézin E.** 2002. Modes d'administration des antibiotiques et émergence de résistance chez les bacilles à Gram négatif. *J Antibiotiques* **4** : 2836-2841.
24. **Bergogne-Bérézin E.**2000. Optimiser l'efficacité des antibiotiques/minimiser la résistance aux antibiotiques: un paradigme pour le nouveau millénaire. *J antibiotiques* **2** : 202-208
25. **Birge E.A.** 1994. *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. Ed Springer, third ed. **8**: 174-239; **12**: 318-327.
26. **Blazques J.** 2003. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antibacterial resistance. *J Clin Infectious Diseases* **37**: 1201-9.

27. **Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Sirot J.** 2003. Effect of D240G substitution in novel EBLS CTX-M-27. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **52**: 29-35.
28. **Bonnet R.** 2004. Growing group of beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1-14.
29. **Bonnet R.** 2006. β -lactamines et Enterobacteries. In Courvalin.....
30. **Bourlioux P.**1990. Hygiène hospitalière pratique. Ed- Lavoisier 41-51
31. **Boutiba-Ben-Boubaker I, Ben Salah D, Besbes M, Mahjoubi F, Ghozzi R.** 2002. Multirésistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*: étude multicentrique. *J Tunisie médicale* **80** (1): 26-28.
32. **Boutiba I, Ghozzi R, Jouaihia W, Mahjoubi F, Thabet L, Smaoui H, Ben Hassen A, Hammami A, Kechrid A, Ben Redjeb S.** Résistance bactérienne aux antibiotiques en Tunisie : Données de 1999 à 2003. *Rev Tun Infectiol.*2007;1(4):5-11.
33. **Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F, Siad N.** 2009. Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie), résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006-2007. *Jmed et Mal Infect* **39, 2: 142-143**
34. **Bradford P.A.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *J Clin Microbiology* **14**: 933-51
35. **Bratu S, Landman D, Haag R.** 2005. Rapid spread of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *J Arch Intern Med* **165**: 1430-5.
36. **Brenwald N.P, Andrews J.M, Jevons G.** 2003. Detection of ciprofloxacin resistance in *Haemophilus influenzae* using nalidixic acid and BSAC methodology. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **51**: 1311-2.
37. **Brenwald N.P, Jevons G, Andrews J.M, Xiong J.H, Hawkey P.M, Wise R.** 2004. An outbreak of CTX-M-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: the importance of using cefpodoxime to detect extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrobiol Agents Chemother* **46**:871-3.
38. **Brisse S, Verhoef J.** 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyr A* and *parC* gene sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 915-24.

39. **Bryskier A.** 1999. Fluoroquinolones (1). Classification, propriétés physicochimiques, activités antibactériennes et pharmacocinétiques. Encyclo Méd Chir, Maladies infectieuses, 8004-B-10.
40. **Bucholz U, Bronzwaer S, Goettsch W.** 2001. New results from the european antimicrobial resistance surveillance system (EARSS): Implications for interventions efforts. Proceeding of the the 11 th European congress of clinical Microbiology and Infections Deases (ECCMID); Apr 1-4; Istambul.
41. **Bush K.** 1994. Enzymes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. In Sensibilité et résistance des pathogènes. La lettre de l'infectiologue **20(LX)**: 658-670.
42. **Bush K.** 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobiol therapy. J Clin Infect Dis **32**: 1085-1089.
43. **Cartelle M, Del Mar Thomas M, Molina F, Moure R, Villanuova R, Bou G.** 2004: High level Resistance to ceftazidime conferred by Novel enzyme CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp 240-Gly Substitution. Antimicrob Agents Chemother.**48**: 2308-2313.
44. **Chanawong A, M'Zali F.H, Heritage J, Xiong J.H, Hawkey P.M.** 2002. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **46**: 630-7.
45. **Chavez J, Ladona MC, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes V.** 2001. SHV-1 betalactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Agents chemother **45**: 2856-2861
46. **Chiew YF.** 2003. Detection of extended-spectrum β -lactamases in a Singapore routine clinical microbiology laboratory. J Diagn Microbiol infect Dis **45**: 77-79.
47. **Chung K.I, Lim T.H, Koh Y, Song J.H, Kim W.S, Choi J, Mand Aush Y.H.** 1992. Nosocomial pneumonialin medico-surgical intensive care unit. J Korean Med Sci **7**: 241-251.
48. **Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R.** 2004. Risk Factors for development of Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Bacteria in Nonhospitalized Patients. Eur J Microbiol Infect Dis **23**: 163-167.
49. **Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.** Communiqué 2005. Edition Janvier 2005.
50. **Condron P.E, Moland E.S, Sanders C.C.** 1997 Occurrence and Detection of Extended spectrum β -lactamase in Meembers of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical center: Seek and you May find.. J clin Microbial **35** : 2593-259.

51. **Coudron P, Hanson N.D, Climo M.W.** 2003. Occurrence of extended-spectrum and AmpC β -lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiology **41**: 772-7.
52. **Courvalin P, Leclercq R, Bingen E.** 2006. AntibioGramme. 141. ED. Masson.
53. **Dabernat H, Seguy M, Faucon G, Delmas C.**2004. Epidémiologie et évolution de la sensibilité aux β -lactamines des souches de *Haemophilus influenzae* isolées en 2001 France. Médecine et maladies infectieuses **34** : 97-101.
54. **D'Agata E.M.C, Gerrits M.M, Tang Y.W, Samore M, Kusters GJ.** 2001. Comparison of Pulsed-Field Electrophoresis And Amplified Fragment-Length Polymorphism For Epidemiological Investigations of Common Nosocomial Pathogens. J Infection Control And Hospital Epidemiology **22**: 550-54.
55. **Dawis M.A, Isenberg H.D, France K.A, Jenkins S.G.** 2003. In vitro activity of gatifloxacin alone in combination with cefepime, meropenem, piperacillin and gentamicin against multidrug-resistant organisms. J Antimicrobiol Chemotherapy **51**: 1203-1211.
56. **De Gheldre Y, Avesani V, Berhin C, Delmée M, Glupczynski Y.** 2003. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended- β -lactamases. J Antimicrobiol Chemotherapy **52**: 591-597.
57. **De Raffles C.A, Carmo J.R, Sader H.S, Medeiros E.A, Vicentim E, Silva R.M.** 2003. Première description de CTX-M β -lactamase de *Klebsiella pneumoniae* au Brésil. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **43**: 52-4.
58. **De Silva V, Mantilla Anaya E.M, Reguero Reza J.R, Gonzales Mejia M.T, Pulido Manrique E.B.** 2006. Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Bogota, Colombia. J Clin . Microbiol **44**: 1919-1924
59. **Decré D, Gachot B, Lucet J.C, Arlet G, Régnier B.** 2000. Surveillance épidémique des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre étendu (K.p BLSE) dans un service de réanimation. Rev Française des laboratoires **320**: 31-38.
60. **Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A.** 2003. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. Research in Microbiology **154**: 9-16.

61. **Di Martino P, Sirot D, Joly A, Darfeuille-Michaud A.** 1999. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4 producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun* **64**: 2266-2273
62. **Dong Y, Chellius M.K, Brisse S, Kozyrovska G, Triplet E.W.** 2003. Comparisons between two *Klebsiella*: the plant endophyt *K.pneumoniae* 342 and clinical isolate *K.pneumoniae* MGH78578. *J Symbiosis* **35**: 247-259.
63. **Ducki S, Blech M.F.** 2004. Surveillance des bactéries multi résistantes en Lorraine: étude d'incidence multicentrique de trois ans. *J Médecine et maladies infectieuses* **34**: 70-75.
64. **Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer H, Chanal C, Sirot D.** 2002. CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-14 β -lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **46**: 534-7.
65. **Eckert C.V, Gautier M, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Houcine Z, Barnaud G, Delisle F, Phillipon A, and Arlet G.** 2004. Dissemination of CTX-M-Type β -lactamases among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *J Microbiol Agents Chemotherapy* **Apr**:1249-1255.
66. **El Kholy M, Bassim H, Hall G.S, Procop G.W, Longworth D.L.** 2003. Antimicrobiol resistance in Cairo, Egypt 1999-2000: a survey of five hospitals. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **51**: 625-630.
67. **Enquête de prévalence nationale des infections nosocomiales 2001.** Résultats préliminaires- 5mars 2002. Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN).
68. **Etat de résistance aux antibiotiques des bactéries isolées du CHU de Constantine.** Octobre 2003. Projet national whonet.
69. **Eyquem A, Alouf J, Montagnier L.** 1998 ^a. *Traité de microbiologie clinique.* Ed Piccin. 2: 369-395.
70. **Eyquem A, Avril J.L, Carlet J.** 1998 ^b. Infections nosocomiales. In *Les infections nosocomiales et leur prévention.* Ellipses. 25: 65-70/
71. **Farah A, Boutefnouchet N, Dekhil M, Bouzerna N.** 2007. *Klebsiella pneumoniae* productrice de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. *J Scientific Study & Research* **VIII(2)**: 199-215.
72. **Fauchère J.L et Avril J.L.** 2002. *Bactériologie générale et médicale.* Ed Ellipses. **15**: 252-253; **10**: 151-176

73. **Foissaud V, Penier-Gros-Claude J.P, Roudy Y, Clavier B, Dussean J.Y, Thierry J.** 1998. L'antibiogramme quantitatif est-il un marqueur épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, sa comparaison à l'électrophorèse en champ pulsé. *J Path Biol* **46**: 452-458.
74. **Ford P.J, Avison M .B.** 2004. Evolutionary mapping of the SHVB-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J of antimicrobial Chemotherapy* **54**: 69-75
75. **Friedland Ian, Stinson L, Ikaidi M, Harm S, Woods G.L.** 2003. Resistance in Enterobacteriaceae: Results of a multicenter surveillance study, 1995-2000. *Infect control hosp Epidemiol* **24**:607-612.
76. **Fung C.P, Hu B.S, Chang F.Y.** 2000. A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. *J Infect Dis* **181**: 2075-9.
77. **Galani I, Xirouchaki E, Kanellakopoulou K, Petrikkos G and Giamarellon H.**2002. Transerable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobiol agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. *Clini Microbiol infect* **8** : 579-588.
78. **Gangoue-Pieboj J, Miriagou V, Vourli S, Tzelepi E, Ngassem P, Tzouvelekis S.** 2005. Emergence of CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae in Cameroon and characterization of a blaCTX-M-15-carrying Element. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **49**(1): 441-443.
79. **Gastmeier Petra M.D, Sohr D, Forester D, Schulgen G, Schumacher M, Daschner F, Rüden H .** 2000. Identifying outliers of Antibiotic Usage In Prevalence Studies On Nosocomial Infections. *J Infect Control Hospital Epidemiol* **21**: 324-328.
80. **Giraud-Maurin C, Fosse T.** 2003. A seven-year survey of *Klebsiella pneumoniae* producing TEM-24 extended-spectrum β -lactamase in Nice University Hospital (1994-2000). *J Hospital Infection* **54**: 25-31.
81. **Gniadkowski M.** 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (EBLSs) and EBLS-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* **7**: 597-608
82. **Goldstein FW.**2002. Limites de l'antibiogramme. Courvalin.
83. **Goldstein FW.** 2007. Sulfamides et trimethoprime. In *Antibiogramme*. Courvalin P. 2 ème ed: 341-348.

84. **Gonet J.P, Pillipeau G.**1992. Comment interpréter les résultats d'une analyse de variance collection # STAT-ITCF. Avec appui de L'ANDA. Paris ed.
85. **Grimont F.**, Meugnier H., Forey F. 2007. Lysotypie, bactériocytotypie, ribotypie. Bactériologie clinique 2 Ed: 259-282.
86. **Guiraud J.P.** 1998. Microbiologie alimentaire. 255. Ed Dunod
87. **Gupta A, Gabriel P, Todd B.** 2002. An outbreak of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. J Health Epidemiology of America **21**: 6-9.
88. **Haeggman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, and Brise S.**2004. Diversity and evolution of the class a chromosomal Beta- lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*. J of antimicrobiol and chemotherapy **24**: 2400-2408.
89. **Hansen D.S, Mestre F, Alberti S.**2003. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing. Revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. J Clin Microbiol **37**: 56-62.
90. **Hanson N.D.** 2003. AmpC β -lactamases what do we need to know for the future. J Antimicrobiol Chemotherapy **52**: 2-4.
91. **Harbarth S, Haris A.D, Carmeli Y.**2001. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in Gram negative bacilli. J Clin Infectious Diseases **33**: 1462-8.
92. **Harbarth S, Rohner P, Safran E, Garbino J, Aukenthaler R, Pillet D.** 1998. Resistance to amikacin and gentamicin among Gram negative blood stream isolates in university hospital between 1989 and 1994. J Clin Microbiol and Infect **4**: 199-204.
93. **Hart C.A.** 2001. Molecular Characterization of a Novel Plasmid-Encoded Cefotaximase (CTX-M-12) Found in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Kenya. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **45**(7): 2141-2143.
94. **Hausen D.S, Skov R, Benedi J.V, Sperling V and Kolmos H.J.** 2002. *Klebsiella* typing: pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in comparison. J Clin Microbiol infect **8**: 397-404.
95. **Held T.K, Jendrike N.R.M, Rukavina T, Podschun R, Trautman M.** 2000. Binding to an Opsonophagocytic Activity of O-antigen-specific Monoclonal antibodies against Encapsulated and nonencapsulated *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 strains. Infect Immun **68**: 2402-2409.
96. **Hernandez J.R, Martinez-Martinez L, Canton R, Coque T.M, Pascual A, and Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH).** 2005. Nationwide study of

- Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **49**: 2122-2125.
97. **Heseltine P.**2000. Has resistance spread to the community. J Clinical Microbiology and Infectious Diseases **6** (Suppl 2): 11-16.
98. **Ho P.L, Yung R.W.H, Tsang D.N.C.** 2001. Increasing resistance of Streptococcus pneumoniae to fluoroquinolones: results of Hon Kong multicenter study in 2000. J Antimicrobiol Chemother **48**: 659-65.
99. **Holt J.G, Krieg N.R, Smeath P.H.A, Staley J.T, Williams S.T.** 1994. Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology. Ninth Ed Williams et Wilkins.181.
100. **Hooper D.C.** 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. J Clin Infect Dis **31**: S24-S28.
101. **Hooper D.C.** 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. J Emerg Infect Dis **7**: 337-41.
102. **Hosein I.K, Hill D.W, Jenkins L.E, Magee J.T.** 2002. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. J Appl Microbiol **92**(suppl1): 90S-97S.
103. **Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Rabino G, Eluk O, Kassis I, Braun E, Oren I.** 2007. First outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella* in an Israeli university hospital. J Infection Control and Nosocomial Infection **24**: 34-8.
104. **Jacoby A, Mills Debra M, Chow N.** 2004. Role of β -lactamases and porins in Resistance to Ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobiol Agents And Chemotherapy, **48**: 3203-3206
105. **Jacoby G.A, Chow N, Waites K.B.** 2003. Prevalence of plasmid –mediated quinolone resistance. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **47**: 559-562.
106. **Jacoby G.A, Munoz-Price L.S.** 2005. The new beta-lactamases. J NEJM **352**: 380-391.
107. **Jarlier V, Nordmann P.** 2000. Entérobactéries et bêta-lactamines. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Botler C. Précis de bactériologie clinique. Ed Paris; ed ESKA 649-665.
108. **Jarlier V.** 1995. Antibiorésistance des bacilles à Gram negative en reanimation. In l'infection acquise en réanimation. Ed Arnette Blackwell 93-116.
109. **Jehl F, Chomarar M, Weber M, Gerard A.**2003. De l'antibiogramme à la prescription. Ed, Biomérieux 31-64.

110. **Jonas D, Spitzmüller B, Daschner F.D, Verhoef J, Brisse S.** 2004. Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. *J Reseach in Microbiology* **155**: 17-23.
111. **Karp BE; Engberg J:** Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health. A critical review of published data. *J of Antimicrobiol Chemotherapy* (2004) **51**, 60
112. **Kariuki S, Corkill G, Revathi G, Musoke R, Hart C.A.** 2001. Molecular Characterization of a Novel Plasmid-Encoded Cefotaximase (CTX-M-12) Found in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Kenya. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **45**(7): 2141-2143.
113. **Kariuki S, Corkill J.E, Revathi G, Musoke R, Hart A, Keynan Y, Rubinstein E.** 2007. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *International journal of Antimicrobiol Agents* **6**: 2474-2479
114. **Kim S.Y, Park Y.J, Yu J.K, Kim H.S, Park Y.S, Yoon J.B, Yoo J.Y, Lee K.** 2007. Prevalence and mecanisms of decreased susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **57**: 85-91.
115. **Kim Y.M, Rheem Y, Lee J.C, Seol S.Y, Lee D.T, Cho D.T.**2005. CTX-M and SHV-12 β -lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isoltes of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. *FEMS Microbiol. Lett* **245**: 93-98.
116. **Kollef M.H.** 2001. Optimizing antibiotic therapy in the intensive care unit setting. *J Critical Care* **5**: 189-94.
117. **Kronvall G, Kahmeter G, Myhre E, Galas M F.** 2003. A new method for normalized interpretation of antimicrobial resistance from disk test results for comparative purposes. *Clin Microbiol Infect* **9**: 120-132
118. **Kümmerer K.** 2003. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **52**: 5-7.

119. **Labadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R, Arlet G.** 2008. Dissemination of ESBL, and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria J Antimicrob Chemother 62(1): 13-136.
120. **Lai Y.C, Yang S.L, Peng H.L, Chang H.Y.** 2000. Identification of genes present specifically in a virulent strains of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun **68**: 7149-7151.
121. **Lambert T, Courvalin P.** 2000. Entérobactéries et aminosides. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C (eds). Précis de Bactériologie Clinique. ESKA, Paris 666-677.
122. **Lambert T.** 2007. Aminosides et bactéries à Gram négatif. AntibioGramme. Courvalin P. 2^{ème} édition : 226-246.
123. **Lartigue M.F, Poirel L, Héritier C, Tolun V, Nordmann P.** 2003. First description of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumonia* in Turkey. J Antimicrobiol Chemotherapy **52**: 315-316.
124. **Lautenbach E, Patel J.B, Bilker W.A.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risque factors for infection and impact of resistance on out homes. J Clinical Infectious Diseases **32**: 2206-12.
125. **Lavigne J.P, Bonnet R, Michaux-Charachon C, Jourdan J, Caillon J, Sotto A.** 2004^a. Post-antibiotic and post β -lactamase inhibiteur effects of ceftazidime plus sulbactam on extended spectrum β -lactamase producing Gram-negative. J Antimicrobiol Chemotherapy **53**, 616-619
126. **Lavigne J.P, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sotto A.** 2004^b. Molecular Epidemiology of Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum beta-lactamases in a French Hospital. J Clin. Microbiol **42**: 3805-3808.
127. **Le Minor L, Sansonetti Ph, Richard Cl, Grimont F, Mollaret H.H, Bercavier H, and Alonso J.M.** 1990. Entérobactéries. In Bactériologie Médicale, Léon Le Minor et Michel Véron. 390-472. Médecine-sciences, Ed Flammarion.
128. **Le Minor L, Véron M.** 1989. Bactériologie médicale. Ed Flammarion 2^{ème} édition, médecine sciences. 427-432
129. **Lemmen S.W, Häfner H, Zollmann D, Stanzell S, Lütticken R.** 2004. Distribution of multi-resistant Gram-negative Versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. J of Hospital Infection **56**, 191-197.
130. **Lewis J.S, Herrera M, Wikes B, Patersson J.E, Jorgenson J,H.** 2007. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-lactamases (ESBLs) as

- the predominant ESBL Isolated in a US. Health Care System. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **51**: 4015-4021.
131. **Li C, Nicolau D.P, Lister P.D, Quintilliani R, Nightingale C.H.** 2004. Pharmacodynamic study of β -lactams alone and in combination with β -lactamase inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa* possessing an inducible β -lactamase. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **53**:297-304.
132. **Livermore D.M, Brown D.F.J.** 2001. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Agents Chemother* **48**: 59-64.
133. **Livermore D.M, Canton R, Gniadkowski M, Nordman P, Rossolini G.M, Arlet G, Poirel L, Woodford N.** 2007. Changing face of ESBLs in Europe. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **50**(2): 165-174.
134. **Livermore D.M.** 2003. Bacterial resistance: origin, epidemiology, and impact. *J Clin Infect Dis* **36**: S11-S23.
135. **Loeffler J.M, Garbino J, Lewis D.** 2003. Antibiotics consumption, bacterial resistance and their correlation in a Swiss university hospital and its adult intensive care units. *J Scandinavian Infectious diseases* **35**: 843-50.
136. **Luzzaro F, Docquier J.D, Colimon C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini G.M, Toniolo A.** 2004. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates of VIM-4 Metallo- β -lactamase Encoded by a conjugative Plasmid. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **48** (2): 648-650.
137. **Luzzaro F, Mezzatesta M.** 2006. Trends in production of extended spectrum betalactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* **44**: 1659-64.
138. **Maccario J.** 2003. Apports et limites des modèles mathématiques d'une épidémie, les modèles sont-ils bons? *J Médecine et maladies infectieuses* **33**: 1-2
139. **Mamalouk K, Boutiba-Ben Boubaker I, Gautier V, Vimont S, Picart B, Ben Rejab S, Arlet G.** 2006. Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains in a Tunisian Hospital. *J. Clin Microbiol* **44**: 4049-4056.
140. **Martinez-Martinez L, Pscual A, Jacoby G.A.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *J Lancet.* **351**: 797-9.
141. **Medeiros A.A.** 2000. Cooperative evolution of mechanisms of β -lactam resistance. *J Clin Microbiol Infect Dis* **6**: 27-33.

142. **Melano R, Corso A, Petrani A, Centron D, Orman B, Pereyra A, Moreno N, Galas M.** 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated in Argentina. *J Antimicrobiol chemotherapy* **52**: 36-42.
143. **Melek A, Cigdem K, Durmaz R, Aktas E, Cizmeci Z.** 2003. Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella species* in Neonatal intensive care unit. *J infec control and hospital epidemiology.* **7**: 495-500.
144. **Mena A, Placencia V, Garcia L, Hidalgo O, Ayes J.I, Péres J.L, Oliver A.** 2006. Characterization of a Large Outbreak by CTX-M-1 Producing *Klebs* Mechanisms Leading to In Vivo Carbapenem Resistance Development. *J Clin Microbiol* **44** (8): 2831-7
145. **Meunier O, Stoessel P, Saint-Laurent P, Lutin P, Jehl F, Scheffel J.M, Monteil H, Tempé J.D, Bientz M.** 1997. Rôle des laboratoires d'hygiène et de bactériologie dans la prise en charge d'une épidémie à *Enterobacter aerogenes* multirésistantes aux antibiotiques. *Ann biol* **55** : 129-37.
146. **Meyer A, Deïania J, Bernard A.** 2004. Résistance aux agents antimicrobiens. In Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} edi, Ed DOIN. Biosciences et techniques collection dirigée par Fagarella J et Calos A.
147. **Midolo P.D, Matthews D, Fernadez C.D.** 2002. Detection of extended-spectrum β -lactamases in the routine clinical microbiology laboratory. *J Pathology* **34**: 362-4.
148. **Moland E.S, Hauson N.D, Herrera V.L, Black J.A, Lockhart Th.J, Hossain A, Johnson J.A, Goering R.V, Thomson K.S.** 2003. Plasmid mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrobiol chemotherapy* **51**: 711-714.
149. **Monteil H.** 1999. Bactériologie. *J Med Mal Inf* **25**: 9-19.
150. **Moubarek C, Doucet-Populaire F, Hamze M, Daoud Z, Weill F.X.** 2005. First Extended-Spectrum β -lactamase (CTX-M-15) in Lebanon. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **49**(2): 864-65.
151. **Murbach V, Dhoyen N, Linger L.** 2001. Evidence for a true post β -lactamase-inhibitor effect of clavulanic acid against *Klebsiella pneumoniae* and heamophilus influenzae. *J Clin Microbiology Infection* **7**: 661-5.
152. **Naas T, Bentchouala C, Lima S, Lezzar A, Smati F, Scheffel J.M, Nordmann P.** 2008. Multidrug-resistant *Salmonella enteritica* serotype Senftenberg Kentucky and

- Ohio isolates producing CTM-3 β -lactamases from Constantine, Algeria. ICAAC, Washinton.
153. **Nauciel C.** 2000. Bctériologie médicale. P 55-64 .Ed Masson
154. **Nasic H, Poirel L, Nordmann P.** 2005. Further Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant in Enterobacteriaceae in Turkey. J Antimicrob Agents Chemother **49**: 2146-2147.
155. **Navarro F, Miro E.** 2002. Update on CTX-M-type β -lactamases. J Medical Microbiology **13**: 63-73
156. **Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Schwaber M.J, Leavitt A, Schwartz D, Carmeli Y.** 2004. Protocol for the Accelerated Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from Blood Cultures. Eur J clin Microbiol Infect Dis **23**: 200-202.
157. **Nicklin J, Graeme-Cooke K, Paget T, Killington R.** 2000. L'essentiel en Microbiologie. Ed Berti. **E**: 130-133.
158. **Noah C, Brabetz W, Gronow S, Brade H.** 2001. Cloning, sequencing, and functional analysis of three glycosyltransferases involoved in the biosynthesis of the inner core region of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. J Innate Immunity **7**: 25-33.
159. **Nordmann P, Mammeri H.** 2007. Resistance plasmidique aux quinolones. J Antibiotiques **9**(4) : 246-253
160. **Nordmann P, Poirel L.** 2002. Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. Clin Microbiol Infect **8**: 321-331
161. **Nordmann P.** 2006. L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones chez les Entérobactéries. J Pathologie Biologie **54**: 7-9.
162. **Ofek I, Messika A, Kalina M, Keisari Y, Podschun R, Sahly H, Chang D, McGregor D, Crouch E.** 2001. Surfactant protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun **69**: 24-33.
163. **Oliver A, Perez-Dia J.C, Coque T.M, Baquero F, Canton R.** 2001. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **45**: 616-20.
164. **Park C.H, Robicsek A, Jacoby G.A, Sahn D, Hooper D.C.** 2006. Prevalence in the United State of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother **50**: 3953-5

165. **Pasteran F.G, Guerriero L.L.O, Radice G, Maggiore R, Rapoport M, Di Martino A, Galas M.** 2008. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. J EID **14**(7): 2151-62
166. **Paterson D.L, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casselas J.M, Goosens H, Mulazimoglu L, Trenholme G.** 2004. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum-lactamases. J Clinical Infectious Diseases **39**(1): 31-37.
167. **Paterson D.L, Rice L.B, Bonomo R.A.** 2001. Rapid method of extraction and analysis of extended-spectrum β -lactamases from clinical strains of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin. Microbiol Infect **7**: 709-711.
168. **Paterson D.L.** 2000. Recommendation for treatment of infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). J Clin Microbiol Infect **6**: 460-463.
169. **Paterson D.L, Hujer K.M, Hujer A.M, Yeiser B, Bonomo M.D, Rice L.B.** 2003. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from seven countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -lactamases. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **47**(11): 3554-3560.
170. **Pattharachayakul S, Neuhauser M.M, Quinn J.P and Pendland S.L.** 2003. Extended-spectrum β - lactamase (EBLS) - producing *Klebsiella pneumoniae*: Activity of single versus combination agents. J. of antimicrobial chemotherapy **51**(12): 737-748.
171. **Périchon B, Courvalin P, Galimand M.** 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G405 in 16S Rrna and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in E-coli. J Antimicrob Agents Chemother **51**: 2464-9.
172. **Peyret M, Albertini M.T, Ollen M, Davenas C, and Blanc V.** 1993. Detection des phenotypes de résistance des Enterobactériaceae aux aminoglycosides avec le système expert ATB plus. J Path Biol **41**: 329-336.
173. **Phillippon A, Arlet G.** 2006. β -lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpetuel! J Ann Biol Clin **64** (1): 37-51.
174. **Pichardo C, Rodriguez-Martinez J.M, Pachon-Ibanez M.E, Conjeo C, Ibanez-Marinez J, Marinez-Martinez L.** 2005. Efficacy of cefepime and imipenem in experimental murine pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing CMY-2 β -lactamase. J Antimicrob Agents Chemother **49**: 3311-16.

175. **Pillai Dylan R, Melano R, Rawte P, Lo S, Tijet N, Fuksa M, Roda N, Farell D.J, Krajden S.** 2009. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Canada. J Antimicrob Chemother **15**(5): 1-8.
176. **Pimkin M, Edelstein M, Palagin I, Narezkina A, Stratchounski L.** 2002. Epidémiologie moléculaire des pneumonies de *Klebsiella pneumoniae* CTX-M de 21 hôpitaux russes. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **42**: 1874-76.
177. **Pina P, Pangon B, Rio Y, Chardon H, Lallali A.K, Allouch P.Y.** 2000. Sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques en Unités de soins intensifs. J Path Biol **48**: 485-489.
178. **Plesiat P, Zhha-Zarifi I.** 1996. Résistance par imperméabilité et par efflux chez les bacilles à Gram négatif. La lettre de l'infetiologie **16** : 495-507.
179. **Podschun R, Fischer A, Ullman U.** 2000. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol **49**: 115-119.
180. **Poirel L, Leviandier C, Nordmann P.** 2006. Prevalence and Genetic Analysis of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants Qnr A and QnrS in Enterobacteriaceae Isolates from a French University Hospital. J Antimicrob Agents Chemother **50**: 3992-3997.
181. **Poole K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. J Clin Microbiol Infect **10**: 12-26.
182. **Potz Nicola A.C, Colman M, Warner M, Reynolds R, Livermore D.M.** 2004. False-positive extended-spectrum β -lactamase tests for *Klebsiella oxytoca* strains hyperproducing K1 β -lactamase. J Antimicrobiol Chemotherapy **40**: 491-3.
183. **Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.A.** 2007. Microbiologie, chap 36, pp 826-846. Ed de boeck.
184. **Prévost G, Piemont Y, Monteil H.** 1993. Intérêt de l'électrophorèse en champ pulsé en épidémiologie moléculaire. Lettre Infect **8**: 279-283.
185. **Programme Canadien d'évaluation externe de la qualité, groupe consultatif sur la résistance aux antibiotiques.** 1998. Lignes directrices pour l'évaluation de la sensibilité des Enterobacteriaceae résistants aux antibiotiques à cause des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et le signalement des cas.
186. **Queenan A.M, Bush K.** 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev **20**: 440-58.

187. **Quentin C, Arpin C, Dubois V, André C, Lagrange I, Fischer I, Brochet JP, Grobost F, Jullin J, Dutihl B, Larribet G, Noury P.** 2004. Antibiotic Resistance Rates and phenotypes Among Isolates of Enterobacteriaceae in French Extra-hospital practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 185-193.
188. **Quinteros M, Radice N, Gardella M, Rodriguez M, Costa D, Korbenfeld E, and Microbiology Study Group.** 2003. Extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae I Buenos Aires, Argentina, public Hospital *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **47**: 2864-2867.
189. **Rahal J.J.** 2000. Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem?. *J Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **6** (Suppl 2): 2-6.
190. **Rasheed J.K, Anderson G.J, Yigit H.** 2000. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamases reference strain, *klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **44**: 2382-8.
191. **Rebuck J.A, Olsen K.M, Fey P.D, Langnas A.N, Rupp M.E.** 2000. Characterization of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. *J Clin Infect Dis* **31**: 1386-1372.
192. **Reverdy ME, Bes M, Verdier I, Jarraud S, Lina G, Vandenesch F, Etienne J.** 2005. Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* résistant à l'oxacilline et multisensibles aux antibiotiques ou sensible à l'oxacilline et multirésistantes aux antibiotiques Abstr.P: 101, 25ème reunion interdisciplinaire de chimiothérapie antiinfectieuse.
193. **Régnier B.** 1995. Les bactéries multirésistantes aux antibiotiques en réanimation: contexte épidémiologique et stratégie de maîtrise. *Path Biol* **44**(2): 113-123.
194. **Rice L.B, Carias L.L, Hujer A.M.** 2000. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **44**: 362-5.
195. **Richard C.** 1994. A propos de la définition des Enterobactériaceae . *Techniques et Biologie* **4**: 96-103.
196. **Riegel P.** 2002. Aspects bactériologiques des infections urinaires nosocomiales. *J Médecine et maladies infectieuses* **33**: 255s-265s.

197. **Robert J, Cambau E, Grenet K, Trystman D, Péan Y, Fievet M.H and Jariler V.** 2001. Trends in quinolons susceptibility of enterobacteriaceae among inpatients of a large university hospital: 1992-98. *Clin Microbiol Infect* **7**: 553-561.
198. **Robicsek A, Jacoby G.A, Hooper D.C.** 2006. The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* **6**: 629-40.
199. **Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G.A, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper D.C.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* **12**: 83-8.
200. **Rodriguez H-Villalobos, Struelens M. J.** 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: Implications pour le réanimateur. *Rev Réanimation* **15** (3) :205-213.
201. **Rodriguez-Martinez J.M, Pascual A, Garcia I, Martinez-Martinez L.** 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *J of Antimicrobiol Chemotherapy* **52**: 703-706.
202. **Ros A.** 1999. La résistance bactérienne ou le naufrage des antibiotiques. VIIIème assemblée annuelle des CLIN du sud-Est. Lyon. 28 octobre.
203. **Sahly H, Ancken H, Benedi V.J, Forestier C, Fussing V, Hansen D.S, Ofek I, Podshun R.** 2004. Impairment of Respiratory Burst in polymorphonuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 20-26.
204. **Saint S, Veenstra D.L, Lipsky B.A.** 2000. The clinical and economic consequences of nosocomial central venous catheter-related infection: are antimicrobial catheters useful? *J Infect Control Hospital Epidemiol* **21**: 375-380.
205. **Scavizzi M, Labia R, Petitjean O, Elbhar A.** 2000. L'antibiogramme de l'analyse des populations bactériennes à la thérapeutique. *J Antibiotiques* **2**: 122-134.
206. **Schumacher H, Scheibel J, Moller J.K.** 2000. Cross-resistance patterns among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with decreased susceptibility to cefuroxime. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **46** (2): 215-221.
207. **Schwartz D.** 1975. Comparaison d'une repartition observée à une repartition théorique. Le test χ^2 . Chapitre VI. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 67-73. Ed Flammarion Médecine Sciences (3^{ème} tirage).
208. **Singleton P.** 2005. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Ed Dunno, 6^{ème} édition. Sciences SUP. **15**: 464-467.

209. **Sirot J, Nicolas-Chanoine M.H, Chardon H, Avril J.L, Cattoen C, Croix J.C, Dabernat H, Fosse T, Ghnassia J.C, Lecaillon E, Marmonier A.** 2002. Susceptibility of Enterobacteriaceae to β -lactam agents fluoroquinolones: a 3-year survey in France. *J Clin Microbiol Infect* **8**: 207-213.
210. **Soussy C.J.** 1994. Mécanismes de résistance de bas niveau aux quinolones chez les bacilles à Gram négatif et conséquences thérapeutiques possibles. *La lettre de l'infectiologue* **5**: 143-52.
211. **Stahl J.P, Pavese P, Epaulard O, Blanc M, Brion J.P.** 2004. Le traitement empirique des bactériémies. *J Med et maladies infectieuses* **34**: S55-S56.
212. **Steward C.D, Rasheed J.K, Hubert S.K, Biddle J.W.** 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* **39**: 2864-72.
213. **Stewart B.A, Lessing M.P.A.** 1999. A hospital outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Hospital Infection* **41**: 71-78.
214. **Stone Patricia W, Gupta A, Loughrey R.N, Della-Latta Ph, Cimiotti R.N, Larson E, Rubenstein D, Saiman L.** 2003. Attributable Coast And Length Of Stay Of An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak In A Neonatal Intensive Care Unit **24**: 601-606.
215. **Struve C, Bojer M, Krogfelt K.A.** 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *J Infect Immun* **76**(9): 4055-65.
216. **Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D.** 2004: evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae strain collection. *J Antimicrobiol Chemotherapy* **54**: 134-138.
217. **Talon D.** 1999. The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistance bacteria. *J Hospital Infection* **43**: 13-17.
218. **Tigaud S.** 2000. Mécanismes de résistance aux antibiotiques. [http://Lyon-Sud.univ-Lyon1.fr/bacterio.Collège/olrbo.html](http://Lyon-Sud.univ-Lyon1.fr/bacterio/Collège/olrbo.html).
219. **Tolun V, Kuçukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, Catal C, Ang-Kuçuker M, Ang O.** 2004. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiology and Infection* **10**: 70-83.

220. **Touati A, Benaloula S, Djoudi F, Madoux J, Brasme L, De Champs C.** 2007. Characterization of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Hospital Environments in Algeria. *J Microbiol Drug Resistance* **13**(2): 85-89.
221. **Tran J.H, Jacoby G.A.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5638-42.
222. **Trouillet J.L, Chastre J.** 2000. Pneumopathies nosocomiales microbiennes et impact thérapeutique. *J Antibiotiques* **2**: 95-100.
223. **Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R, Montuori E, Leone F, Fadda G, Cauda R.** 2006. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors, molecular Epidemiology, and Clinical outcome. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **50**: 498-504.
224. **Tzouvelekis L.S, Bonomo R.A.** 1999. SHV-type beta-lactamase. *Curr Phar Des* **5**: 847-64.
225. **Urban C, Rahal J.** 2004: mechanisms and detection of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* **15**: 63-72.
226. **Valverde A, Coque T.M, Garcia-San Miguel L, Baquero F, Canton R.** 2008. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrobiol Chemother* **61**: 64-72.
227. **Villegas M.V, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, Casellas J.M, Ayala J, Quinn JP.** 2004. CTX-M-12 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **48** (2): 629-631.
228. **Wachino J.I, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Ito H, Arakawa Y.** 2004. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a Novel Class A β -lactamase, GES-3, in a Neonatal intensive care unit in Japan. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* **48**(6): 1960-1967.
229. **Wang M, Sahm D.F, Jacoby G.A, Zhang Y, Hooper D.C.** 2004^a. Activities of newer Quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the

- plasmide-mediated quinolone Resistance Determinant *qnr*. Antimicrobiol Agents And Chemotherapy Apr: 1400-1401.
230. **Wang M, Sahm Daniel F, Jacoby George A, and Hooper David C.** 2004^b. Emerging plasmid- Mediated quinolone resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the united states. J antimicrobiol agents and chemotherapy **2**: 1295-1299.
231. **Westreenen M.V, Paauw A, Fluit SB, Van Dijk W, Verhoef J.** 2003. Occurrence and spread of SHV extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Curaçao. Clin Infect Diseases **32**: 156-67.
232. **White Antony R, Kaye C, Poupard J, Pypstra R, Woodnutt G, Wyne B.** 2004. Augmentin (amoxicillin/clavulanate) in the treatment of community-acquires respiratory tract infection: a review of the continuing development of an innovative antimicrobial agent. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **53**(Suppl 1): i3-i20.
233. **Winokur P.L, Canton R, Casselas J.M, Legakis N.** 2001. Variation in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific region. J Clinical Microbiology and Infectious Diseases **32**(Suppl 2): S94-S103.
234. **Winokur P.L, Eidelstain M.V, Stesiouk O, Pfaller M.A, Jones R.N.** 2000. Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum β -mactamases. J Clin Microbiol Infect **6**: 103-108.
235. **Wise R.** 2003. Antimicrobiol resistance: the microbe struggle for survival. J Equine Veterenery **35**: 501-1.
236. **Wise R.** 2004. The relentless rise of resistance?. J Antimicrobiol Chemother **54**: 306-310.
237. **Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y.** 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an E-coli isalte. Antimicrob Agents Chemother **51**: 3354-60.
238. **Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, Satoh K, Washidu R.** 2003. Production of CTX-M extended-spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo β -lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998-2000, in the Kinki region of Japan. J Antimicrobiol Chemotherapy **51**: 631-638.
239. **Yigit H, Queenan A, Anderson A.M, Domenechsanchez G.J, Biddle A, Steward CD.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC1, from a

- carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **45**: 1151-61.
240. **Yu W.L, Wu L.T, Pfaller M.A, Jones R.N.** 2004. Emergence of two *Klebsiella pneumoniae* Isolates Harboring Plasmid-Mediated CTX-M15 β -Lactamase in Taiwan. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy **43**: 453-6.
241. **Zahar J. R, Ghaffart P, Kamga I, Perronne V.** 2003. Audit des prescriptions antibiotiques dans un service de maladies infectieuses. Presse Med **32**: 1208-12.
242. **Zhanel G, Walkty A, Nichol K.** 2003. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance Streptococcus pneumoniae clinical isolates obtained from across Canada. J Diagnostic Microbiology and infectious Disease **45**: 63-7.
243. **Zingg W.** 2008. Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les enfants en suisse. J Swiss Paediatric Surveillance Unit. **7**: 4-8.
244. **Zwet W.C, Parlevliet G.A, Savelkoul P.H.M, Stoof J, Kaiser A.M, Koeleman J.G.M, Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E.** 1999. Nosocomial outbreak of gentamicin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit controlled by a change in antibiotic policy. **42**: 295-302.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen found in more than a hundred years. Today she is the leader of the germs responsible for severe nosocomial infections and difficult to treat, epidemics are caused by strains resistant to a wide variety of antibiotics. The first ESBL-producing strains belonged to the species *Kp* Their frequency has increased in this species of 1% to 10% -25% between 1985 and 1991 and then decline to be around 5 to 10% in France. Our numbers are much higher in the frequency of ESBL + *Kp* and resistance rates for β -lactams and aminoglycosides, both at regional and national levels.

The following objectives of our study are:

- Measure the frequency of *Klebsiella pneumoniae* in the study centers at the University Hospital of Benbadis based services and pathological samples.
- Check the clonality of strains.
- To study the clonal dissemination in the hospital by making the antibiotype the biotype and pulsotypes.

To obtain a more accurate epidemiological information, a factor analysis (CVA) was conducted, based on the results of the antibiotype and the χ^2 test for the comparison of incidence rates from one year to another.

One hundred and seventy strains were collected between 2002 and 2004 at the University Hospital of Constantine. In our study among the 170 strains 93% and 7% hospital are external. Three epidemiological markers are used: biotype, antibiotype and pulsotypes. The most pronounced resistance to blood cultures is recorded. The distribution of resistance service level indicates that the ICU is by far the provider of multi-resistant strains. Comparing the results of the three markers indicates indisputably that pulsotypes is by far the most discriminating marker.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, epidemiological marker, antibiotic resistance, ESBL,

ملخص :

Klebsiella pneumoniae هي بكتريا مضرّة انتهازية اكتشفت منذ أكثر من 100 عام، حيث وجدنا أنّ الدراسات التي أجريت عليها اليوم تبين أنها على رأس الجراثيم المسؤولة عن أوبئة في المستشفيات، المستعصية و صعبة العلاج. إن أول البكتريا الفارزة لـ β لكتماز واسعة المجال b1se كانت لـ *k.p* ولقد زادت نسبتها عند هذه البكتيريا من 1-10 بالمئة بين 1985 و 1991، لتقل بعد ذلك إلى حوالي 5-10 بالمئة في فرنسا. لكن أرقامنا أظهرت نسب مرتفعة من ناحية *k.p* الفارزة لـ β لكتماز واسعة المجال. وكذلك نسب المقاومة لـ β لكتمين و المضادات الحيوية ذات الطبيعة السكرية وهذا على المستوى الجهوي و الوطني .

أهداف هذه الدراسة

- قياس نسبة *K.p* في مراكز الدراسة في المستشفى الجامعي ابن باديس وذلك وفقا للمصالح و العينات المرضية.
- مراقبة سلبية العزلات.
- دراسة أنتشار السليلة في المستشفى باستعمال النمط الحيوي وكذلك النمط الحيوي المضاد و الهجرة الكهربائية بالتدفق.
- أستعمل مربع كاي χ^2 عن طريق تحليل التباين وهذا لمتابعة التغيرات الممكنة من سنة لأخر.

تم عزل 170 عينة بين 2002 و 2004، 93 % منها عزلت داخل المستشفى و 7% من خارج المستشفى. ثلاث مؤشرات وبائية مستعملة النمط الحيوي، النمط الحيوي المضاد و الهجرة الكهربائية بالتدفق. المقومات الأكثر حدة سجلت في عينات الدم. توزع المقومات على مستوى المصالح يبين أن مصلحة الإنعاش هي مقر للعزلات المتعددة المقاومة. مقارنة نتائج المؤشرات الثلاث تبين بدون نقاش أن مؤشر الهجرة الكهربائية بالتدفق هو المؤشر الأكثر تفريق بين العزلات.

الكلمات المفتاحية

- *Klebsiella pneumoniae* – المؤشر الوبائي – مقاومة المضادات الحيوية – β – لكتماز مجال واسع.

Résumé

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste découvert depuis plus d'une centaine d'années. Aujourd'hui elle est le chef de file des germes responsables d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques. Les premières souches productrices de BLSE appartenaient à l'espèce *K.p.* Leur fréquence a augmenté chez cette espèce de 1% à 10%-25% entre 1985 et 1991, pour diminuer ensuite et se situer autour de 5 à 10% en France. Nos chiffres sont beaucoup plus élevés quant à la fréquence des *K.p.* BLSE+ et les taux de résistance pour les β -lactamines et les aminosides, aussi bien au niveau régional que national.

La mise en évidence du caractère épidémique de l'infection est importante pour la mise en œuvre rapide des mesures préventives. Dans ce but, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Mesurer d'abord la fréquence de *Klebsiella pneumoniae* dans les centres d'étude au CHU de Benbadis en fonction des services et des prélèvements pathologiques.
- Vérifier la clonalité des souches.
- Etudier la dissémination clonale à l'hôpital en réalisant l'antibiotypie, la biotypie et la pulsotypie.

Afin d'obtenir une information épidémiologique plus précise, une analyse factorielle discriminante (AFD), a été réalisée, se basant sur les résultats de l'antibiotypie, ainsi que le test du χ^2 pour la comparaison des taux d'incidence d'une année à l'autre.

Cent soixante dix souches sont collectées entre 2002 et 2004 au niveau du CHU de Constantine. La fréquence d'isolement de la *K.p.* est de 2,08% parmi 21600 prélèvements effectués en 2004. Dans notre étude parmi les 170 souches 93% sont hospitalières et 7% sont externes. Trois marqueurs épidémiologiques sont utilisés: biotypie, antibiotypie, et pulsotypie. La comparaison des résultats des trois marqueurs indique indiscutablement que la pulsotypie est de loin le marqueur le plus discriminant.

Mots clés: *Klebsiella pneumoniae*, Marqueur épidémiologique, Résistance aux antibiotiques, BLSE,

Corrections

Break-points des antibiotiques selon le CLSI:

Antibiotiques	Break-points
Amx/Amp	14-16
Amx+ac.clav	15-20
Ticarcilline	15-19
Tic+ac-clav	15-19
Pipéracilline	18-20
Pip/tazobactam	18-20
Imipénème	14-15
Céfazoline	15-17
Céfoxitine	15-17
Céfotaxime	15-22
Ceftazidime	15-17
Céfotétan	15-17
Aztréonam	16-21
Cefépime	15-17
Tobramycine	13-14
Amikacine	15-17
Gentamicine	13-14
Kanamicyne	14-17
Isépamycine	15-17
Triméthoprimé- Sulfaméthaxazole	11-15
Ac-nalidixique	14-18
Pefloxacine	13-15
Ciprofloxacine	16-20

Références bibliographiques:

- Naas T., Lezzar A., Benchouala C., Smati F., et col. 2008. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Senftenberg, Kentucky and ohio isolates producing CTX-M-3 B-lactamases from Constantine, Algeria. JCAAC, Washinton.
- Regnault JP. 2002. Eléments des microbiologie etd'immunologie. Ed Décarie pp 501-502.