

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université A. Mira de Bejaïa  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département microbiologie**

**MEMOIRE DE FIN DE CYCLE**

**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER ACADEMIQUE EN  
MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE ET MEDICALE**

**THEME :**

Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des  
souches de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter  
cloacae* isolées à partir des prélèvements pathologiques  
au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaia

Réalisée par :

**HAMOUDA Yamina**

Encadrée par :

**B.YANAT**

Membre de jury's :

**Président (e) : Mme GHAROUT Alima.**

**Examineur (1) : M. DJOUDI Ferhat.**

**Examineur (2) : Mme. BELHADI Karima.**

**2012/2013**

# *Dédicace*

*À mon père ainsi qu'à ma chère mère*

*À ma sœur Yasmine et mon petit frère Islem*

*Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.  
En reconnaissance de tous les sacrifices consentis  
par tous et chacun afin de me permettre  
d'atteindre cette étape de ma vie*

*À Smail mon bras droit et mon rayon de soleil.*

*Enfin, à ; Rym, Jaous, Yasmine, Sara,  
Merieme, Hakima, Anicia et tous ceux qui me  
sont chers*

*Ce travail vous est dédié*

*Yamina HAMOUDA*

# Remerciements

Il m'est spécialement agréable, d'exprimer toute ma reconnaissance envers les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté leurs soutiens dans la réalisation de ce mémoire.

Au premier rang ma promotrice **Mademoiselle YANAT B**, son aide, ses conseils précieux, ses critiques constructives, ses explications et suggestions pertinentes qui m'ont donné un coup d'aide pour réaliser mon projet de fin d'étude convenablement, **Docteur TOUATI A/Aziz** pour ses précieux conseils et son aide et toute l'équipe du laboratoire Ecologie Microbienne (les doctorants et les étudiants de la promotion MMM) pour leurs soutien moral.

Ainsi que **M.HAMDOUNI Kamel**, **Melle BOUDJEMAI Sabrina** et toute l'équipe du laboratoire de m'avoir accordé la chance d'effectuer mon stage au sein de leur établissement **E.P.H AKLOUL Ali d'Akbou**.

Je remercie de même ma famille et la petite famille de **BENMAOUCHE Kamel** pour leurs grandes attentions, leurs grands soutiens et encouragements tout au long de l'évolution de ce travail, et de l'énorme intérêt qu'ils ont montré envers ce sujet.

Enfin ma gratitude s'exprime pour les membres de jury pour avoir accepté de d'examiner mon travail.

# Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1

## *CHAPITRE I : Matériels et méthodes*

<b>I. Souches bactériennes.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Test de sensibilité aux antibiotiques.....</b>	<b>8</b>
II.1. Antibiogramme standard .....	8
II.2. Détermination des CMI de la céftazidime et de la ciprofloxacine sur milieu solide....	10
<b>III. Etude des phénotypes de résistance aux <math>\beta</math>-lactamines.....</b>	<b>11</b>
III.1. Recherche de la $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE) .....	11
III.2. Recherche de la production de céphalosporinases par l'acide boronique .....	12
<b>IV. Etude des phénotypes de résistance aux quinolones .....</b>	<b>13</b>

## *CHAPITRE II : Résultats*

<b>I. Isolement des souches.....</b>	<b>14</b>
<b>II. Test de sensibilité aux antibiotiques.....</b>	<b>15</b>
II.1. Etude du profil de résistance aux antibiotiques.....	15
II.2. Détermination des CMI sur milieu solide .....	17
<b>III. Etude des phénotypes de résistance aux <math>\beta</math>-lactamines.....</b>	<b>17</b>
III.1 Recherche de la production de BLSE .....	17
III.2. Recherche de la production de la céphalosporinase par l'acide boronique .....	18
<b>IV. Etude des phénotypes de résistance aux quinolones .....</b>	<b>20</b>

## **CHAPITRE III : Discussions**

<b>Discussion.....</b>	<b>22</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>26</b>
<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>27</b>
<b>Annexes</b>	

# Liste des figures

<i>N°</i>	<i>Titre de la figure</i>	<i>Page</i>
1	Test de synergie.	13
2	Test des disques combinés.	13
3	Résultats de la CMI.	17
4	Image de synergie pour la souche AK124 productrice de BLSE.	18
5	Image de synergie pour la souche AK32 productrice d'AmpC.	19
6	image de résultat du test des disques combinés pour la souche AK32 productrice d'AmpC	19

# Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre du tableau</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Liste des antibiotiques testés	<b>9</b>
<b>II</b>	Préparation de la gamme d'antibiotiques	<b>10</b>
<b>III</b>	Données concernant les patients porteurs des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> et d' <i>Enterobacter cloaca</i>	<b>14</b>
<b>IV</b>	Résultats des tests de sensibilité des souches isolées aux antibiotiques	<b>16</b>
<b>V</b>	Diamètre des zones d'inhibition du DD-test	<b>18</b>
<b>VI</b>	Résultats du test de synergie et du test des disques combinés avec l'acide boronique	<b>19</b>
<b>VII</b>	Mécanismes probables de résistance aux quinolones	<b>20</b>

# Liste des abréviations

**AAC** : Aminoside N-acétyl-transférase.

**AAC(6')Ib-cr** : Aminoglycoside acetyltransferase ciprofloxacin resistance.

**ACC** : Ambler class C.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AmpC** : Céphalosporinases.

**ANT** : Aminoside O-nucléotidyl-transférase.

**APH** : Aminoside O-phosphotransférase.

**ARNr 16S** : Acide ribonucléique ribosomal de 16S.

**BLSE** : Bêta Lactamine à spectre Etendu.

**C2G** : Céphalosporine de 2<sup>ème</sup> Génération.

**C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> Génération.

**C4G** : Céphalosporine de 4<sup>ème</sup> Génération.

**CA-SFM** : Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CMY**: Céphamycine.

**CTX-M** : Céfotaximase -Munich.

**DD-test** : test Double Disc

**DHA-1**: Dhahran Hospital.

**E. cloacae** : Enterobacter cloacae

**E. coli** : Escherichia coli

**EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique.

**FOX** : Céfoxitine.

**GES-1**: Guyana extended-spectrum -lactamase.

**IMI** : Imipenem-hydrolyzing -lactamase.

**K. pneumoniae** : Klebsilla pneumoniae

**KES** : Klebsiella, Enterobacter et Serratia.

**KPC** : Klebsiella pneumoniae carbapenemase.

**LAT** : Latamoxef.

**MH** : Mueller Hinton

**MIR** : Miriam hospital.

**MOX** : Moxalactam.

**NDM-1** : New Delhi métallo- -lactamase-1.

**NMC** : Not metalloenzyme carbapenemase.

**OXA** : Oxacillinase.

**OXA-1**: Oxacillin hydrolyzing capabilities.

**PLP** : Protéines de liaison aux pénicillines.

**Qnr** : Quinolone resistance.

**QRDR** : Quinolone resistance determining region.

**RmtF** : rRNA methyltransferase F.

**SFO-1** : Serratia fonticola.

**SHV-1** : Sulphydryl variable.

**SME** : Serratia marcescens enzyme.

**UFC** : Unité Formant Colonies

**VEB-1** : Vietnam extended-spectrum beta-lactamase.

**VIM** : Veronaintegron- encoded métallo- -lactamase.

**VP** : Voges-Proskauer.



# ***Introduction***

## ***INTRODUCTION***

---

Le milieu hospitalier est un environnement propice à la propagation des infections. Ces dernières se transmettent ; au hasard par contact entre patient ou par le personnel soignant ; d'autant plus facilement que les sujets sont proches et qu'ils sont fragilisés par leur maladie (Madigan et Martinkon, 2007)<sup>1</sup>. En Algérie, la prévalence de l'infection nosocomiale est 7.9 % et les infections urinaires arrivent en tête, suivies respectivement par les infections des sites opératoires et les infections pulmonaires (Amazian et al. 2010)<sup>2</sup>. Ces infections sont dites « Nosocomiales » causées par des bactéries pathogènes opportunistes, parmi lesquelles, on citera l'espèce bactérienne *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*, appartenant à la famille des entérobactéries. Ces germes sont ubiquitaires et saprophytes du tube digestif de l'homme et des animaux. Ces deux espèces ont pris une importance croissante du fait de leur implication dans les infections nosocomiales et les infections communautaires infectant préférentiellement les voies urinaires, respiratoires et des plaies (Podschun et al. 1998<sup>3</sup> ; Sanders sanders, 1997)<sup>4</sup>.

*K. pneumoniae* et *E. cloacae* sont des bacilles à Gram négatif, facilement cultivable, aéro-anaérobies facultatives, oxydase négative, elles réduisent le nitrate en nitrite, fermentent le glucose et le lactose avec production de gaz, utilisent le citrate comme source de carbone et ayant une réaction de Voges-Proskauer (VP) positive. Ces espèces se retrouvent dans le groupe KES (*Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*) (Hart et Shears, 1997)<sup>5</sup>. *K. pneumoniae* est un germe immobile, encapsulé, apparait sur les milieux ordinaire ou sélectives sous forme de colonies rondes, volumineuses, bombées et brillantes, d'aspect muqueux (Fasquelle, 1959)<sup>6</sup>. Elle se diffère des *E. cloacae*, par la production de l'uréase (Hart et Shears, 1997)<sup>7</sup>. En revanche, *E. cloacae* est un germe mobile, non capsulée, l'aspect des colonies est variable selon les milieux de cultures tel que sur le milieu ordinaire les colonies sont arrondies, brillantes et opaques mais non muqueuse (Mousterdier, 1972)<sup>8</sup>.

La famille la plus importante d'antibiotiques utilisée en médecine humaine est la famille des « -lactamines » qui ciblent la paroi bactérienne et se fixe sur les PLP (Protéines de liaison

---

<sup>1</sup> Madigan M. T et Martinkon J. M. (2007). Brock Biologie des micro-organismes. 11<sup>ème</sup> édition. Pearson Education France. P840.

<sup>2</sup> Amazian K, Rossello J, Castella A, Sekkat S, Terzaki S, Dhidah L, Abdelmoumène T, Fabry J. (2010). Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. EMHJ. 10, 1070-1078.

<sup>3</sup> Podschun R, Ullmann U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol. 4, 589-603

<sup>4</sup> Sanders WE JR, Sanders AC. (1997). Enterobacter spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. Clin Microbiol. 2, 220-241

<sup>5</sup> Hart T et Shears P. (1997). Atlas de poche de microbiologie. 1<sup>er</sup> édition. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. P71

<sup>6</sup> Fasquelle R. (1959). Elements de bactériologie médicale. 3<sup>ème</sup> édition : Médicales Flammarion. Paris-VI. 149p.

<sup>7</sup> Hart T et Shears P. (1997). Atlas de poche de microbiologie. 1<sup>er</sup> édition. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. P71

<sup>8</sup> Moustardier G. (1972). Bactériologie medical. 4<sup>ème</sup> edition. ParisVI. P 250.

## INTRODUCTION

---

aux pénicillines) afin d'inhiber la synthèse du péptidoglycane. La consommation d'antibiotique par indication empirique augmente chaque année, cela confère une résistance aux bactéries avec une augmentation persistante. Ainsi, des mécanismes de résistance ont été développés chez les bactéries, parmi lesquels la production d'une enzyme dite «  $\beta$ -lactamase » qui dégrade les  $\beta$ -lactamines (Cavallo et al. 2004)<sup>9</sup>. Ces enzymes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques et produites d'une manière inductible ou constitutive. Elles peuvent être classées en deux groupes sur la base des différences dans leur mécanisme catalytique : les  $\beta$ -lactamases à sérine qui sont subdivisées en trois classes moléculaires A, C et D et les métallo- $\beta$ -lactamases (classe B) qui ont une activité liée à la présence d'un ou de deux ions  $Zn^{+2}$  dans leur site actif (Bush et Jacoby, 2010)<sup>10</sup>.

La classe A inclue les pénicillinases, inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, telle que les BLSE de type CTX-M et les nouvelles carbapénémases KPC ; la classe B rassemble les métallo enzyme résistantes à l'acide clavulanique mais inhibées par l'EDTA, tel que IMI et VIM ; la classe C regroupe les céphalosporinase (AmpC) insensibles à l'acide clavulanique mais inhibée par la cloxacilline comme l'enzyme CMY et FOX; la classe D rassemble les oxacillinases, hydrolysant la cloxacilline et peut-être inhibées par l'acide clavulanique, elle constitue une famille extrêmement composite en terme de spectre d'hydrolyse tel que l'OXA-1 (Bush et Jacoby, 2010)<sup>11</sup>.

*K. pneumoniae* sont naturellement résistantes aux pénicillines, par la production des pénicillinases à bas niveau qui sont fortement inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Ces pénicillinases sont des  $\beta$ -lactamases chromosomiques SHV-1 et LEN-1 (Chaves et al. 2001<sup>12</sup>; Hæggman et al. 2004<sup>13</sup>) appartiennent au sous-groupe 2b selon la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby et à la classe A selon la classification d'Ambler (Bush et Jacoby, 2010)<sup>14</sup>, hydrolysent certaines  $\beta$ -lactamines telles que l'ampicilline, la ticarcilline et la pipéracilline (Bonnet, 2006)<sup>15</sup>.

---

<sup>9</sup> Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. (2004). Bêtalactamines Beta-lactam antibiotics. EMC-Maladies Infectieuses. 1, 129-202

<sup>10</sup> Bush K, Jacoby GA. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Agents Chemother. 3, 969–976.

<sup>11</sup> Bush K, Jacoby GA. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Agents Chemother. 3, 969–976.

<sup>12</sup> Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés A. (2001). SHV-1  $\beta$ -lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 10, 2856–2861.

<sup>13</sup> Hæggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. (2004). Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*. Agents Chemother. 7, 2400–2408.

<sup>14</sup> Bush K, Jacoby GA. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Agents Chemother. 3, 969–976

<sup>15</sup> Bonnet R. (2006).  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. 2<sup>ème</sup> édition. AntibioGramme. P141.

## INTRODUCTION

---

D'autre part, *E. cloacae* produit naturellement des céphalosporinases à bas niveau (AmpC) chromosomiques inductibles qui se trouvent dans le groupe 1 selon la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby et à la classe C selon la classification moléculaire de Ambler. Ces enzymes sont portées sur le gène *ampC* et régulées par les gènes *ampD*, *ampG* et *ampR* (Jacoby, 2009)<sup>16</sup>. Elles hydrolysent quelques  $\beta$ -lactamines telles que l'ampicilline, l'amoxicilline, les céphalosporines de 1<sup>er</sup> génération et les céphamycines (céfoxitine et céfotétan) (Bonnet, 2006)<sup>17</sup> elles sont résistantes à l'acide clavulanique, le tazobactame et le sulbactame mais sensibles à l'acide boronique et à la cloxacilline (Thomson, 2010)<sup>18</sup>.

Depuis l'apparition des  $\beta$ -lactamases à spectre élargie (BLSE), en 1985, en particulier chez les bacilles à Gram négatif, leur émergence n'a cessé d'augmenter un peu partout dans le monde (Philippon et Arlet 2006)<sup>19</sup>. L'émergence des nouvelles  $\beta$ -lactamases de type CTX-M a été décrite chez *K. pneumoniae* et *E. cloacae* dans plusieurs pays, parmi lesquels, le CTX-M-1 retrouvé en Algérie et en Inde (Nedjai et al., 2012<sup>20</sup> ; Parveen et al., 2012<sup>21</sup>), le CTX-M-15 décrit à l'Union des Emarats Arabes, au Japon et au Canada (Alfaresi et al., 2011<sup>22</sup>; Kanamori et al., 2011<sup>23</sup> ; Denisuik et al., 2013<sup>24</sup>). D'autres type de BLSE de classe A ont été retrouvées chez *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, telles que SFO-1 au Japon, VEB-1 en France et en Thaïlande, GES-1 au Portugal (Philippon et Arlet, 2006<sup>25</sup>). D'autre part, une BLSE de classe D, OXA-9, a été décrite chez *E. cloacae* au Canada (Poirel et al., 2010<sup>26</sup>).

Telles que les BLSE, les céphalosporinases plasmidique ont été largement répondues. Elles peuvent être portées par le même plasmide que celui des BLSE. Ces enzymes hydrolysent les céphalosporines de 3<sup>eme</sup> génération, les céphamycines (céfoxitine, céfotétan) et résistent aux

---

<sup>16</sup> Jacoby GA. (2009). AmpC  $\beta$ -Lactamases. Clin Microbiol, 161–182.

<sup>17</sup> Bonnet R. (2006).  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. 2<sup>eme</sup> édition. AntibioGramme. P141

<sup>18</sup> Thomson KS. (2010). Extended-Spectrum-  $\beta$ -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. J Clin Microbiol. 4, 1019–1025.

<sup>19</sup> Philippon A, Arlet G. (2006).  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin. 64, 37-51.

<sup>20</sup> Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Med Maladies Infect. 42, 20–29.

<sup>21</sup> Parveen RM, Manivannan S, Harish BN, Parija SC. (2012). Study of CTX-M Type of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase among Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in South India. Indian J Microbiol. 52, 35-40.

<sup>22</sup> Alfaresi M S, Elkoush A A, Alshehhi H M, Abdulsalam A I. (2011). Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United Arab Emirates. Med Prin Pract , 20:177–180.

<sup>23</sup> Kanamori H, Navarro RB, Yano H, Sombrero LT, Capeding MRZ, Lupisan SP, Olvedab RM, Arai K, Kunishima H, Hirakatac Y, Kaku M. (2011). Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae from the Philippines. Acta Trop. 120, 140-145.

<sup>24</sup> Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PRS, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Tailor F, Karlowsky JA, Hoban DJ, Adam HJ, Zhanel GG. (2013). Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC  $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007– 11. J Antimicrob Chemother. 68, 57-65

<sup>25</sup> Philippon A, Arlet G. (2006).  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin. 64, 37-51.

<sup>26</sup> Poirel L, Naas T, Nordmann P. (2010). Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1, 24–38.

## INTRODUCTION

---

inhibiteurs enzymatiques tels que l'acide clavulanique, tel qu'il est le cas de *K. pneumoniae* (Philippon et Arlet, 2006<sup>27</sup>). *E. cloacae* peut aussi acquérir cette résistance par mutation ponctuelles au niveau du régulateur *ampD* ou par la délétion de plusieurs bases nucléotidiques du gène *ampC* afin d'induire une hyperproduction des céphalosporinases et hydrolyser les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (Kuga et al, 2000<sup>28</sup>). L'émergence des céphalosporinases à spectres étendu hydrolysant les céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération est due à mutation du site actif du gène *ampC* (Philippon et Arlet, 2006<sup>29</sup>).

En Algérie, des céphalosporinases plasmidiques associée aux BLSE ont été décrites. Il s'agit de CMY-2 chez *K. pneumoniae* et DHA-1 chez *E. cloacae* (Iabadene et al., 2009<sup>30</sup>). D'autres enzymes de type céphalosporinase ont été rapportées dans d'autres pays tels que l'enzyme FOX en Argentine, MIR en Etat Unis, CMY en Corée, LAT-1 en Grèce, DHA-1 en Taiwan et en Chine, AAC-1 en Allemagne (Philippon et Arlet, 2006<sup>31</sup>).

La résistance aux céphalosporines fait qu'on a recourt de plus en plus à l'utilisation des carbapénèmes, une résistance à ces molécules a émergé parmi les souches de *K. pneumoniae* et *E. cloacae* d'origine clinique et ce par trois mécanismes : imperméabilité, acquisition des métallob-lactamases (IMI et VIM) (classe B) ou des non métallob-lactamases de la famille KPC, IMI/NMC, SME (classe A) ou OXA (classe D) (Livermore et al., 2006). Une étude menée par Szabo et al. (2006) a rapporté que la résistance d'*E. cloacae* envers l'ertapénème était dû à l'imperméabilité ainsi qu'à l'hyperproduction des céphalosporinases. La dissémination des métallob-lactamases, VIM, a été signalée en Algérie chez des souches des entérobactéries parmi *K. pneumoniae* elle et autour du bassin méditerranéen (Robin et al. 2010). L'OXA-48, qui est une carbapénémase de classe D, a été décrite pour la première fois chez *K. pneumoniae* en Turquie (Grall et al., 2011<sup>32</sup>).

Par ailleurs, toutes les souches productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases, y compris les souches ayant des pompes d'efflux surexprimées et une imperméabilité

---

<sup>27</sup> Philippon A, Arlet G. (2006). b-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin. 64, 37-51.

<sup>28</sup> Kuga A, Okamoto R, Matsuhisa Inoue. (2000). ampR Gene Mutation That Greatly Increase Class C -Lactamase Activity in Enterobacter Cloacae. Antimicrob Agents Chemother. 44, 561.

<sup>29</sup> Philippon A, Arlet G. (2006). b-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin. 64, 37-51.

<sup>30</sup> Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, Arlet G. (2009). Prevalence of plasmid-mediated AmpC -lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. Int J Antimicrob Ag. 34, 340-342.

<sup>31</sup> Philippon A, Arlet G. (2006). b-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin. 64, 37-51.

<sup>32</sup> Grall N, Andreumont A, Armand-Lefèvre L. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? J Anti-infect. 16.

## ***INTRODUCTION***

---

membranaire (Pagès, 2004<sup>33</sup>) sont souvent résistantes aux autres familles d'antibiotiques, telles que les fluoroquinolones, le cotrimoxazole, les aminosides ou encore les tétracyclines (Grall et *al.*, 2011<sup>34</sup>).

Les aminoglycosides sont indiqués dans le traitement des infections sévères aux bactéries Gram négatives en milieu hospitalier. Elles sont souvent utilisées en combinaison avec d'autres antibiotiques comme les  $\beta$ -lactamines. Elles agissent au niveau du ribosome bactérien et perturbent la synthèse protéique (Gauzit, 2011). La résistance à cette famille d'antibiotique est souvent par modification enzymatique de la composition du substrat de l'antibiotique, Il existe trois classes d'enzymes en fonction de la réaction catalysée : aminoside N-acétyl-transférase (AAC), aminoside O-phosphotransférase (APH) et aminoside O-nucléotidyl-transférase (ANT). Chaque classe possède des variantes telles que ANT(2'), APH(3') et AAC(6'). Chez les entérobactéries cette résistance est souvent due à la production de l'enzyme AAC(6') modifiant l'acétylation des aminoglycosides (Livermore et *al.*, 2001<sup>35</sup>). La variante AAC(6')Ib dérivant de l'enzyme AAC(6') a décrite, en Algérie, chez deux souches de *K. pneumoniae* (Meradi et *al.*, 2011<sup>36</sup>). D'autre part, la résistance aux aminosides peut être par méthylation de l'ARNr 16S (Chen et *al.*, 2007<sup>37</sup>).

Les quinolones et fluoroquinolones sont des agents antimicrobiens à large spectre utilisés en médecine humaine, vétérinaire et dans l'environnement et interviennent dans la réplication de l'ADN. La résistance à ces molécules d'antibiotique chez les entérobactéries peut être chromosomique par mutation ponctuelle de la région QRDR (Quinolone resistance-determining region) du gène *gyrA* et/ou *parC*, codant pour les sous unités enzymatiques de la l'ADN gyrase (Topoisomérase II) et de la topoisomérase IV respectivement, impliquées dans la réplication du chromosome. Elle peut être aussi plasmidique par la production des protéines Qnr qui protège la cible des quinolones ou l'inactivation enzymatique en produisant l'enzyme AAC(6')Ib-cr qui inactive les fluoroquinolones et les aminosides. Une étude établie au niveau de l'hôpital d'Annaba, a rapporté que parmi 25 souches cliniques, une souche d'*E. cloacae* hébergait le

---

<sup>33</sup> Pagès J-M. (2004). Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *M/S*, vol. 20, N° 3, p. 346-351.

<sup>34</sup> Grall N, Andreumont A, Armand-Lefèvre L. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ?. *J Anti-infect*. 16.

<sup>35</sup> Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. (2001). Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 48, 87-102.

<sup>36</sup> Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Gros Claude JD P, Timinouni M. (2011). Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathol Biol* 59, 73-78.

<sup>37</sup> Chen L, Chen Z-L, Liu J-H, Zeng Z-L, Ma J-Y and Jiang H-X. (2007). Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother*. 59, 880-885.

## INTRODUCTION

---

gène *aac(6')Ib-cr* (Meradi et al., 2011<sup>38</sup>). Autre mécanisme plasmidique aux quinolones, l'expression de la pompe d'efflux QepA spécifique aux quinolones et fluoroquinolones (Strahilevitz et al., 2009<sup>39</sup>). Plusieurs variantes de protéines Qnr ont été décrites, la QnrB a été retrouvé chez *K. pneumoniae* isolée en Corée (Jeon et al., 2011<sup>40</sup>), la Qnr S a été déterminée chez *E. cloacae* isolée en Japon et en Espagne (Kanamori et al., 2012<sup>41</sup> ; Cano et al., 2009<sup>42</sup>).

Une nouvelle métallo- $\beta$ -lactamase transférable ; NDM-1 (New Delhi métallo- $\beta$ -lactamase-1) ; a été retrouvée pour la première fois en Inde chez *K. pneumoniae* (Yong et al. 2009<sup>43</sup>). C'est une carbapénémase, portée par le gène *bla<sub>NDM-1</sub>*, résistante à la majorité des antibiotiques connus ainsi qu'à l'acide clavulanique, le sulbactame et à d'autres inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. C'est pour cela qu'on surnomme les bactéries porteuses de ce gène « Super bactéries » (Charan et al. 2012). Cette enzyme a été décrite chez d'autres entérobactéries retrouvées en Inde, au Pakistan, en Europe (Suède, Royaume Uni, France, Pays-Bas, Allemagne), aux États-Unis, au Canada, en Australie, au Kenya, Aousulta-Nat d'Oman, et à Hong-Kong (Grall et al. 2011<sup>44</sup>). De nouvelles associations de mécanismes de résistances aux Aminoglycosides, récemment détectés chez les *Enterobacteriaceae*, ont émergé dans le milieu hospitalier de l'Inde par la production des NDM-1 et la RmtF méthyltransferase et induisant un haut niveau de résistance (Hidalgo et al., 2013).

Ce caractère multi-résistant que peuvent avoir les souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* conduit à une réduction considérable du champ thérapeutique. Cependant, il est important d'avoir des données actualisées sur l'évolution de cette résistance et les mécanismes entrant en jeu. L'objectif de notre étude est donc d'évaluer la résistance aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* responsables d'infections chez les patients

---

<sup>38</sup> Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Gros Claude JD P, Timinouni M. (2011). Résistance aux quinolones de types qnr, *aac(6')-Ib-cr* chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathol Biol* 59, 73-78.

<sup>39</sup> Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol.* 4, 664–689.

<sup>40</sup> Jeong H S, Bae I K, Shin J H, Jung H J, Kim S H, Lee J Y, Oh S H, Kim H R, M.D, Chang C L, Kho W G, M.D, Lee J N. (2011). Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*. *Korean. J Lab Med.* 31(4): 257–264.

<sup>41</sup> Kanamori H., Yano H., Hirakata Y, Hirofumi A, Arai K, Endo S, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Gu Y, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Kaku M. (2012). Molecular Characteristics of Extended-Spectrum Beta-Lactamases and qnr Determinants in *Enterobacter* Species from Japan. *Plos One*, Volume 7, Issue 6, 37967.

<sup>42</sup> Cano M E, Rodriguez-Martinez J M, Aguero J, Pascual A, Calvo J, Garcia-Lobo J M, Velasco C, Francia M V, Martinez-Martinez L. (2009). Detection of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J Clin Microbiol.* p. 2033–2039.

<sup>43</sup> Yong D, Toleman M.A, Giske C.G, Cho H.S, Sundman K, Lee K, I and Walsh T. R. (2009). Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, *bla<sub>NDM-1</sub>*, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *ANTIMICROB AGENTS CH.* 5046–5054.

<sup>44</sup> Grall N, Andreumont A, Armand-Lefèvre L. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *J Anti-infect.* 16.

## ***INTRODUCTION***

---

hospitalisés et consultants externes, au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaïa en fonction des services et des prélèvements pathologiques. Afin de menée cette étude, la méthodologie suivante a été adoptée :

- Isolement des souches *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* à partir des différents prélèvements pathologiques.
- Etude du profile de résistance aux antibiotiques de ces souches.
- Etude des phénotypes de résistance aux - lactamines.
- Etude des phénotypes de résistance aux quinolones.



# *Chapitre I*

## **I. Souches bactériennes**

Des souches de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter cloacae* ont été isolées durant la période allant de février à avril 2013 au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaia : Akbou, Sidi Aich et Amizour, ont fait l'objet de notre travail. Cette étude a concerné les patients(es) hospitalisés(es) des différents services et consultants externes. Des renseignements à propos du sexe, de l'âge, du type de prélèvement, de l'antibiothérapie lors de l'hospitalisation et de la souche identifiée ont été recueillis pour chaque patient(e) (Annexe I).

Ces souches, issues de divers prélèvements pathologiques, ont été ré-isolées sur le milieu gélosé de Mac Conkey puis identifiées par la galerie API 20E (Bimérieux, Marcy l'Etoile, France) (Annexe II). La lecture se fait par le logiciel Api DENT.

En ce qui concerne les milieux utilisés lors de cette étude, leurs compositions sont données en annexe III.

## **II. Test de sensibilité aux antibiotiques**

### **II.1. Antibiogramme standard**

Toutes les souches d'*E. cloacae* et de *K. pneumoniae* identifiées ont été testées vis-à-vis de 17 antibiotiques (Tableau N°I) appartenant à différentes familles et ce par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2012).

- **Inoculum**

A partir d'une culture fraîche, 3 à 5 colonies sont dissociées dans 5ml d'eau physiologique la suspension bactérienne obtenue est comparée à l'étalon 0.5 Mc Farland (Annexe IV) qui correspond à environ à  $10^8$  UFC/ml. On réalise par la suite une dilution de  $10^{-1}$  (correspondant à environ  $10^7$  UFC/ml).

- **Ensemencement**

Des boîtes de Petri préalablement coulées par le milieu Mueller Hinton à une épaisseur d'environ 4 mm sont ensemencées par écouvillonnage. Puis les disques d'antibiotiques (Tableau N°I) y sont déposés et les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24H.

• **Lecture**

Après mesure des diamètres des zones d'inhibitions obtenus au tour des disques d'antibiotiques testés, l'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (communiqué du CA-SFM, 2012)<sup>45</sup> (Annexe V).

**Tableau N°I : Listes des antibiotiques testés**

Famille/Groupe	Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	Marque
<b>-lactamines</b>				
Aminopénicilline	Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	20+10	Oxoid®
C2G	Céfoxitine	FOX	30	Biomérieux®
C3G	Céfotaxime	CTX	30	Biomérieux®
	Céftazidime	CAZ	30	Biomérieux®
	Céftriaxone	CTR	30	Himedia®
C4G	Céfépime	FEP	30	Oxoid®
Monobactames	Aztreonam	AT	30	Himedia®
<b>Quinolones</b>				
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30	Himedia®
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	Oxoid®
	Ofloxacine	OFX	5	Biomérieux®
	Péfloxacine	PEF	5	Biomérieux®
<b>Autres</b>				
Aminoside	Gentamycine	GEN	15	Biomérieux
	Tobramycine	TOB	10	Biomérieux®
Sulfamides	Cotrimoxazol	SXT	1.25+23.75	Biomérieux®
Polypéptides	Colistine	CL	50	Biomérieux®
Phénicol	Chloramphénicol	C	30	Biomérieux®
Tétracycline	Tétracycline	TE	30 UI	Himedia®

<sup>45</sup> Comité De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie : Recommandations 2012. (Edition de Janvier 2012).

## II.2. Détermination des CMI de la céftazidime et de la ciprofloxacine sur milieu solide (CA- SFM, 2012)<sup>46</sup>

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la céftazidime et de la ciprofloxacine a été déterminée pour toutes les souches résistantes ou intermédiaires à ces antibiotiques afin d'évaluer le niveau de résistance de celles-ci.

La souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 est utilisée comme témoin négatif (sensible).

- **Préparation de la gamme d'antibiotiques**

A partir de deux solutions mères de céftazidime ( $9.10^3 \mu\text{g/ml}$ ) et de ciprofloxacine ( $4.10^3 \mu\text{g/ml}$ ) (SIGMA-ALDRICH), des dilutions à raison de 2 ont été réalisées (Tableau N°II).

**Tableau N° II : Préparation de la gamme d'antibiotiques (CA-SFM, 1995 version 2)<sup>47</sup>**

Concentration initiale de la solution d'antibiotique ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume de la solution mère de l'antibiotique (ml)	Volume du diluant (ml)	Concentration obtenue ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration finale dans le milieu ( $\mu\text{g/ml}$ )
5120	1	1	2560	256
2560	1	1	1280	128
1280	1	1	640	64
640	1	1	320	32
320	1	1	160	16
160	1	1	80	8
80	1	1	40	4
40	1	1	20	2

<sup>46</sup>Comité De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie : Recommandations 2012. (Edition de Janvier 2012).

<sup>47</sup> Comité De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie. (1995).

Norme n°2 : Méthode de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. Version 2.

- **Préparation des boîtes**

19 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont additionnées de 1ml de chacune des différentes concentrations de l'antibiotique préalablement déposé dans des boîtes de Petri. Après homogénéisation, les boîtes sont séchées 30 min à l'étuve. Une boîte de Mueller Hinton sans antibiotiques est utilisée comme témoin.

- **Ensemencement**

A partir d'une suspension bactérienne d'environ  $10^8$  UFC/ml (comparée à l'étalon 0.5 Mc Farland), une dilution de  $10^{-3}$  est effectuée puis 10  $\mu$ l sont prélevés et déposés sur le milieu en 3 spots (environ  $10^4$  UFC/spot). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une ou deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération. Les CMI obtenues pour chaque souche testée par rapport à la céftazidime et la ciprofloxacine sont comparées à la CMI critique définis par le CA-SFM (communiqué du CA-SFM, 2012) (Annexe V).

### III. Etude des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

#### III.1. Recherche de la $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE)

- **Test de synergie (ou DD-test)**

La recherche de la production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE) par le DD-test concerne les souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Ce test consiste à placer des disques de céfotaxime (CTX), de céftazidime (CAZ), de céfépime (FEP) et d'aztréoname (AT) (30  $\mu$ g chacun) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque Amoxicilline/acide clavulanique (AMC) (20 $\mu$ g et 10  $\mu$ g, respectivement). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque Amoxicilline/acide clavulanique et les disques de CTX, CAZ, FEP ou AT indique la production d'une BLSE (Jarlier et al. 1988)<sup>48</sup>.

---

<sup>48</sup> Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G et Philippon A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Infect Dis. 10, 867-878.

### III.2. Recherche de la production de céphalosporinases par l'acide boronique (Su et al., 2012)<sup>49</sup>

Afin de rechercher la production de céphalosporinase chez la souche de *K. pneumoniae* résistante à la céfoxitine, une solution d'acide phenylboronique (339 mg dans 20 ml d'eau distillée) est utilisé comme inhibiteur de l'activité céphalosporinasique et ceux par deux méthodes : le test de synergie et le test des disques combinés.

- **Test de synergie**

Sur une boîte Mueller Hinton préalablementensemencée, des disques d'antibiotiques de céfoxitine (FOX), de céftazidime (CAZ) et de céfotaxime (CTX) (30µg chacun) sont déposés à une distance de 15 mm (centre à centre) d'un disque vierge imbibé de 20 µl d'acide boronique (Figure 1). L'incubation se fait à 37°C pendant 16 à 24h.

La production de la céphalosporinase peut se traduit par l'augmentation de la zone d'inhibition (image de synergie) entre le disque d'acide boronique et les disques d'antibiotiques testés.

- **Test des disques combinés**

Sur une boîte Mueller Hinton préalablementensemencée, des disques d'antibiotiques de FOX, de CAZ et de CTX (30µg chacun) additionnés ou pas de 20µl d'acide boronique sont déposés à une distance suffisamment élongée (Figure 2). L'incubation se fait à 37°C pendant 16 à 24h. En comparant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques testés avec et sans acide boronique, si une augmentation de la zone d'inhibition 5mm est observée, on peut considérer qu'il y a présence de céphalosporinase.

---

<sup>49</sup> Su W.-Y, Gottlieb T, Merlino J. (2012). Optimal phenotypic testing of AmpC beta-lactamases using boronic acid solutions. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:49–51

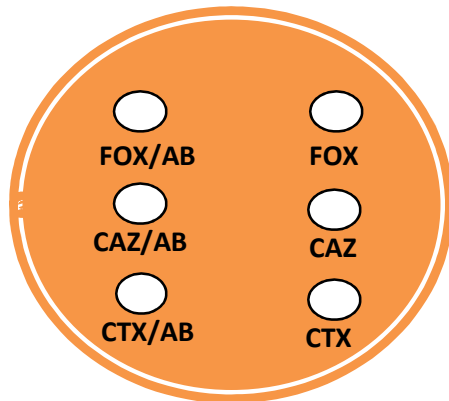


Figure 2 : test des disques combinés

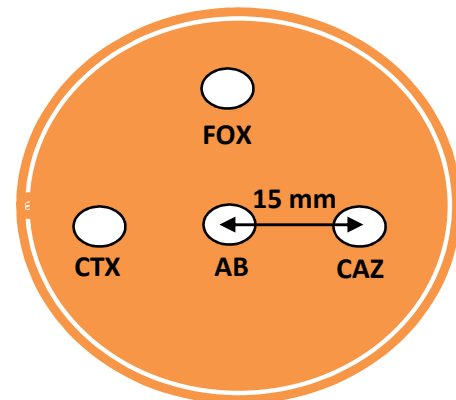


Figure 1 : test de synergie

**Légendes :** FOX : céfoxitine, CAZ : céftazidime, CTX : céfotaxime, AB : acide boronique.

#### IV. Etude des phénotypes de résistance aux quinolones

Cette étude s'effectue par un antibiogramme standard comme cité ci-dessus en diffusant les disques d'acide nalidixique, de ciprofloxacin et de perfloxacin (ou de norfloxacin) sur un milieu gélosé de Muller Hinton. La lecture se fait après 18 à 24h d'incubation.

# *Chapitre II*



## I. Isolement des souches

Au cours de cette étude, 81 prélèvements pathologiques ont été réalisés, au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaia (Akbou, Sidi Aich et Amizour) à partir desquels, huit souches non répétées ont été isolées dont quatre souches ont été isolées de l'hôpital d'Akbou, trois souches de l'hôpital de Sidi Aich et une souche de l'hôpital d'Amizour.

En se basant sur les caractères cultureux et les résultats de la galerie API 20 E (Annexe VI), six souches de *K. pneumoniae* et deux souches d'*E. cloacae* ont été identifiées. Les données concernant les patients à partir desquels les souches ont été isolées sont représentées dans le tableau N°III.

**Tableau N°III : Données concernant les patients porteurs des souches de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter cloacae***

Espèces isolées	Code	Données					
		Hôpital	Service	Sexe	Age	Nature du prélèvement	Antibiotique administré
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AK32	Akbou	Pédiatrie	F	12 mois	Urines	Amoxine®
	AK46	Akbou	Consultant externe	M	49 ans	Pus	-
	AK142	Akbou	Pédiatrie	M	2ans	Gorge	Amoxine®
	Si2	Sidi Aich	Consultant externe	F	Adulte	Urines	-
	Si3	Sidi Aich	Consultant externe	F	Adulte	Urines	-
	AM	Amizour	Chirurgie femme	F	74 ans	Pus	Ciprolon® et Cifacidal®
<i>Enterobacter cloacae</i>	AK124	Akbou	Pédiatrie	M	NN	Pus	-
	Si1	Sidi Aich	Consultant externe	M	25 ans	Urines	-

**F** : Sexe féminin ; **M** : Sexe masculin ; **NN** : Nouveau né.

**Amoxine®** : Amoxicilline ; **Cifacidal®** : Céfazoline; **Ciprolon®** : Ciprofloxacine.

Ces souches se répartissent à part égale entre patients de sexe féminin et patients de sexe masculin et entre patients externes et internes. Il est à noter que la majorité de ces souches sont issues de prélèvements urinaires (4/8 des prélèvements) et que trois patients porteurs de ces souches étaient sous antibiothérapie lors de l'hospitalisation.

## **II. Test de sensibilité aux antibiotiques**

### **II.1. Etude du profil de résistance aux antibiotiques**

L'analyse du profil de résistance des souches bactériennes à 17 antibiotiques a montré que toutes les souches sont sensibles à la colistine et que la résistance aux autres antibiotiques est variable. Ainsi, la souche Si2 de *K. pneumoniae* présente une sensibilité à tous les antibiotiques. Tandis que, les deux souches de *K. pneumoniae* AM et AK 32 et les deux souches d'*E.cloacae* AK124 et Si1 sont multi-résistantes (Tableau N° IV).

Tableau N° IV : Résultats des tests de sensibilité des souches isolées aux antibiotiques

<i>Espèce</i>	Code	FOX	CTX	CAZ	CTR	NA	CIP	PEF	OFX	GEN	TOB	SXT	C	TE	CL	CMI de la CIP (µg/ml)	CMI de la CAZ (µg/ml)
<i>K. pneumoniae</i>	AK32	R	R	S	I	I	S	S	I	S	S	R	R	S	S	Nt	Nt
	AK46	I	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	Nt	2
	AK142	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	Nt	2
	Si2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Nt	Nt
	Si3	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	Nt	Nt
	AM	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	2
<i>E.cloacae</i>	AK124	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	2	32
	Si1	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	64	256

**Légendes :** **R** : Résistante ; **I** : Intermédiaire ; **S** : Sensible ; **FOX** : Céfoxitine ; **CAZ** : Céftazidime ; **CTX** : Céfotaxime ; **CTR** : Céftriaxone ;  
**NA** : Acide nalidixique ; **CIP** : Ciprofloxacine ; **OFX** : Ofloxacine ; **PEF** : Perfloxacine ; **GEN** : Gentamicine ; **TOB** : Tobramycine ;  
**SXT** : Cotrimoxazol ; **CL** : Colistine ; **C** : Chloramphénicol ; **TE** : Tétracycline ; **NT** : Non testé.

## II.2. Détermination des CMI sur milieu solide

Selon les résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu solide (Tableau N° IV et figure 1), on constate qu'une souche de *K. pneumoniae* et une souche d'*E. cloacae* (AM et AK124 respectivement) ont présenté un bas niveau de résistance pour la ciprofloxacine avec une CMI = 2 µg/ml. En revanche, une résistance à plus haut niveau à cet antibiotique a été observée pour la souche d'*E. cloacae* Si1 avec une CMI de 64 µg/ml.

Concernant la ceftazidime, les deux souches d'*E. cloacae* Si1 et AK124 ainsi que la souche de *K. pneumoniae* AM ont montré une résistance de haut niveau (256 µg/ml, 32 µg/ml et 16 µg/ml respectivement). On note par contre, une résistance de bas niveau (2 µg/ml) pour les souches de *K. pneumoniae* AK46 et AK142 (Tableau N° IV).

La figure 3 représente un exemple des résultats de la CMI.

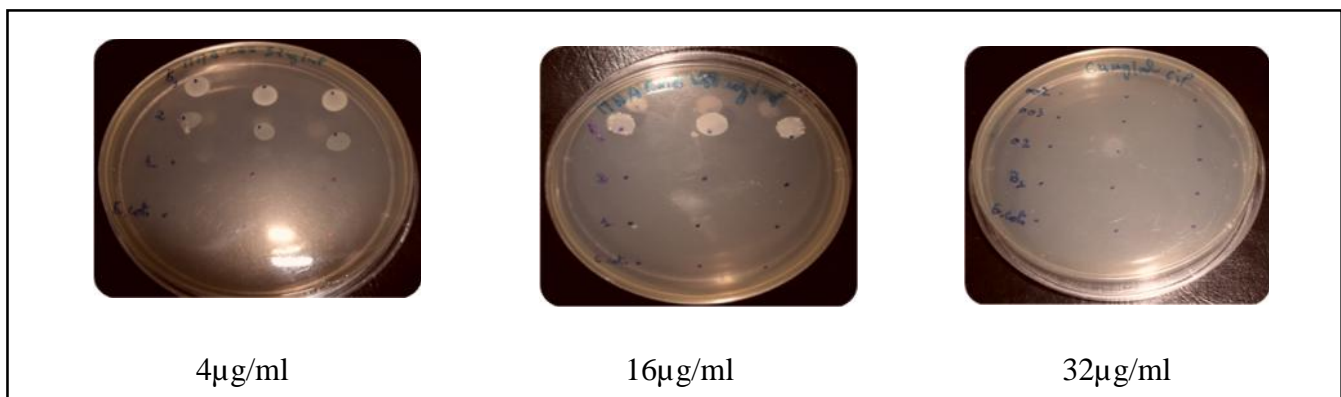


Figure 3 : Résultats de CMI pour la céftazidime

Légende : B1 : la souche d'*E. Cloacae* Si1 ; 2 : la souche de *K. pneumoniae* AM.

## III. Etude des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

### III.1 Recherche de la production de BLSE

- DD-test

Les résultats du DD-test ont montré que les souches AK124, Si1 et AM sont BLSE positives (présence d'image de synergie) et que la souche AK32 est BLSE négative (Tableau N°V) (Figure 4).

Tableau N°V : Diamètre des zones d'inhibition du DD-test

Code	Espèce	Diamètre (mm)					Synergie
		AMC	CTX	CAZ	FEP	ATM	
AK124	<i>E.cloacae</i>	6 (R)	6(R)	18(R)	22(I)	19(R)	<b>Présence</b>
Si1	<i>E.cloacae</i>	25(I)	6(R)	6(R)	14(R)	11(R)	<b>Présence</b>
AM	<i>K. pneumoniae</i>	34(S)	6(R)	6(R)	15(R)	12(R)	<b>Présence</b>
AK 32	<i>K. pneumoniae</i>	30(S)	18(R)	30(S)	30(S)	30(S)	<b>Absence</b>

**Légendes :** **R** : Résistante ; **I** : Intermédiaire ; **S** : Sensible ; **AMC** : Amoxicilline-acide clavulanique ; **CTX** : Céfoxitine ; **CAZ** : Céftazidime ; **FEP** : Céfépime ; **ATM** : Aztréonam.



Figure 4 : Image de synergie pour la souche AK124 productrice de BLSE.

### III.2. Recherche de la production de la céphalosporinase par l'acide boronique

La recherche de la production de céphalosporinase est réalisée pour la souche de *K. pneumoniae* AK32 résistante à la céfoxitine et n'ayant pas donné d'image de synergie avec DD-test. Les résultats du test de synergie et du test des disques combinés en utilisant l'acide boronique comme inhibiteur de céphalosporinases sont représentés dans le tableau N°VI et dans les figures 5 et 6.

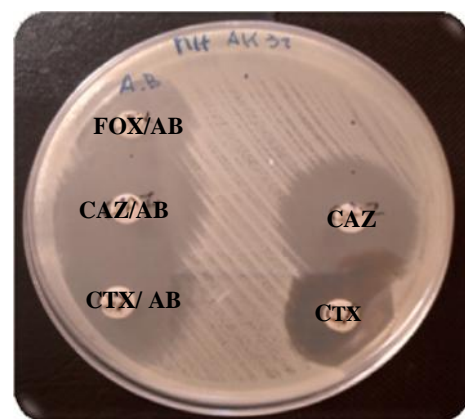
**Tableau N°VI : Résultats du test de synergie et du test des disques combinés avec l'acide boronique**

Code	Espèce	Test des disques combinés (diamètre en mm)						Test de synergie
		FOX	FOX <sup>ab</sup>	CTX	CTX <sup>ab</sup>	CAZ	CAZ <sup>ab</sup>	
AK32	<i>K. pneumoniae</i>	14(R)	26 (S)	18(R)	22 (I)	22(I)	28 (S)	Positif
		Différence des diamètres (mm)						
		12		4		6		

**Légendes :** R : Résistante ; I : Intermédiaire ; S : Sensible. <sup>ab</sup> : avec l'acide boronique ;  
**FOX :** Céfoxitine ; **CAZ :** Céftazidime ; **CTX :** Céfotaxime.



**Figure 5 : Image de synergie pour la souche AK32 productrice d'AmpC.**



**Figure 6 : image de résultat du test des disques combinés pour la souche AK32 productrice d'AmpC .**

Selon les résultats d'études effectuées, en Algérie, au cours de ces dernières années (Touati et al., 2006<sup>49</sup> ; Nedjai et al., 2012<sup>50</sup>), il est probable que les souches AK124, Si1 et AM BLSE positive produisent l'enzyme CTX-M-15, tandis que la souche AK32 AmpC positive produit l'enzyme CMY-2.

<sup>49</sup> Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, Christophe de Champs. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 - lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in B'ejaja, INT J ANTIMICROB AG 397-402.

<sup>50</sup> Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Med Maladies Infect. 42, 20-29.

#### IV. Etude des phénotypes de résistance aux quinolones

Selon Soussy (2006)<sup>51</sup>, en se basant sur la résistance des souches à l'acide nalidixique, à la péfloxacinine et à la ciprofloxacine, il est possible de déterminer le mécanisme de résistance le plus probable (Tableau N°VII).

**Tableau N°VII : Mécanismes probables de résistance aux quinolones (Soussy, 2006)<sup>52</sup>**

NAL	PEF (NOR)	CIP	Mécanisme probable de résistance	Fréquence des phénotypes (%)
S	S	S	Sauvage	83-85
I	S	S	Résuction d'accumulation ou <i>qnr</i>	1
R	S	S	1 mutation dans <i>gyrA</i>	1
R	I	S	1 mutation dans <i>gyrA</i>	3-4
R	R	S	1 mutation dans <i>gyrA</i> + 1 mutation dans <i>parC</i>	1-2
R	R	I	2 mutations dans <i>gyrA</i> + 1 mutation dans <i>parC</i>	1
R	R	R	2 mutations dans <i>gyrA</i> + 1 mutation dans <i>parC</i> ± impermeabilité	8-9

**Légende :** **R** : Résistante ; **I** : Intermédiaire ; **S** : Sensible. **NAL** : Acide nalidixique ; **PEF**: Péfloxacinine, **NOR** : Norfloxacine ; **CIP** : Ciprofloxacine. **gyrA** : gène codant pour l'ADN gyrase ; **parC** : gène codant pour la topoisomérase IV ; **qnr** : gène codant pour les protéines Qnr plasmidique.

<sup>51</sup> Soussy C-J. (2006). Phénotype de résistance aux quinolones chez les entérobactéries. 2<sup>ème</sup> édition. AntibioGramme. Paris VI. P263.

<sup>52</sup> Soussy C-J. (2006). Phénotype de résistance aux quinolones chez les entérobactéries. 2<sup>ème</sup> édition. AntibioGramme. Paris VI. P263.

Quatre des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* identifiées, sensibles aux quinolones

Une seule souche de *K. pneumoniae* (AK32) intermédiaire à l'acide nalidixique et sensible à la ciprofloxacine Tendis que une des souches de *K. pneumoniae* et deux souches d'*E. cloacae* résistantes à l'acide nalidixique, la pefloxacine et la ciprofloxacine et ayant une CMI pour la ciprofloxacine élevée allant de 16 à 256µg/ml.

En comparant ces résultats au tableau N°VII, la souche de *K. pneumoniae* AK32 montre probablement une réduction d'accumulation des porines ou bien héberge le gène *qnr*.

Tendis que la souche de *K. pneumoniae* AM et les deux souches d'*E. cloacae* AK124 etSi1, il est possible qu'elles ont deux mutations au niveau du gène *gyrA* et une mutation au niveau du gène *parC* +/- imperméabilité.



# *Chapitre III*

Durant la présente étude, six souches de *Klebsiella pneumoniae* et deux souches d'*Enterobacter cloacae* ont été isolées, au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Béjaïa (Akbou, Sidi Aich et Amizour) entre Février et Mars 2013.

Il est à noter que la majorité de ces souches sont issues de prélèvements urinaires (4/8 des prélèvements). Cependant, *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter cloacae* ne sont pas aussi fréquemment isolées d'infections urinaires comparé à *E. coli* considérée comme étant la principale espèce uropathogène. En effet, les travaux de Bouzenoune et al., (2009)<sup>53</sup> ont rapporté qu'à partir de 239 souches urinaires isolées entre 2006 et 2007 à l'hôpital d'Ain M'lila (Wilaya d'Oum-EL Bouaghi), 170 *E. coli*, 29 *K. pneumoniae* et 13 *E. cloacae* ont été isolées.

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* a signalée la présence 4/8 souches multi-résistantes : deux souches d'*E. cloacae* (AK124 et Si1) et deux souche de *K. pneumoniae* (AM et AK32), présentant une résistance pour les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, les sulfamides ainsi qu'une résistance variable aux fluoroquinolones, aux aminosides et au chloramphénicol.

Toutes ces souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* restent, cependant, sensibles à la tétracycline et à la colistine. La colistine peut être utilisée comme dernier recours dans le traitement des infections causées par les bactéries multi-résistantes. Toutefois, une émergence du phénomène de résistance à cette molécule chez les entérobactéries y compris *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter cloacae* a été rapportée au cours de ces dernières années en Tunisie et en Grèce (Maalej et al., 2012<sup>54</sup> ; Maraki et al., 2012<sup>55</sup>).

La consommation d'antibiotiques est probablement en relation étroite avec l'émergence et la sélection des bactéries résistantes. Dans notre cas, deux souches de *K. pneumoniae* multi-résistantes (AM et AK32) ont été isolées chez des patients traités soit par l'amoxicilline (Amoxine®) ou par la céfazoline associé avec la ciprofloxacine (Cifacidal® et Ciprolon®).

<sup>53</sup> 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 et 2007. Med Maladies Infect. 39, 142–143.

<sup>54</sup> Maalej SM, Meziou MR, Mahjoubi F, Hammami A. (2012). Epidemiological study of Enterobacteriaceae resistance to colistin in Sfax (Tunisia). Med Maladies Infect. 42, 256–263.

<sup>55</sup> Maraki S, Samonis G, Karageorgopoulos DE, Mavros MN, Kofteridis D, Falagas ME. (2012). In Vitro Antimicrobial Susceptibility to Isepamicin of 6,296 Enterobacteriaceae Clinical Isolates Collected at a Tertiary Care University Hospital in Greece. Antimicrob Agents Chemoter. 6, 3067-3073.

Parmi les souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, 3 / 4 ont été révélées BLSE positives par le DD-test. Il s'agit des souches Si1 et AK124 d'*E. cloacae* et de la souches AM de *K. pneumoniae*. Celles-ci ont montré une CMI élevée pour la céftazidime allant de 16 à 256 µg/ml. Une étude réalisée au niveau de l'unité de soins intensifs de l'hôpital de Tlemcen a montré qu'à partir des 28 souches d'*Enterobacteriaceae* isolées, 4 souches de *K. pneumoniae* et 1 souche d'*E. cloacae* étaient productrices de BLSE avec des CMI de la céftazidime allant de 4 à 32 µg/ml (Baba Ahmed et al., 2012)<sup>56</sup>. La prévalence des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* BLSE positives ne cesse d'augmenter un peu partout dans le monde telle qu'en Iran, au Taiwan et en Tunisie (Zaniani et al., 2012<sup>57</sup>; Lai et al., 2011<sup>58</sup>; Lahlaoui et al., 2012<sup>59</sup>). Ainsi qu'en France des taux de 9,5% et de 39% ont été rapporté en 2006-2007 pour *K. pneumoniae* et *E. cloacae* respectivement alors qu'en 1997-1998 ces taux étaient de 5,1% et de 21% (Belmonte et al., 2010<sup>60</sup>).

En Algérie, les travaux menés par Touati et al. (2006)<sup>61</sup> et Nedjai et al., (2012)<sup>62</sup> ont montré une prédominance du type CTX-M-15 et CTX-M-1 respectivement parmi des souches d'entérobactéries productrices de BLSE, la prédominance CTX-M-1 a été également rapporté chez des souches de *K. pneumoniae* et *E. coli* isolées au Sud de l'Inde (Parveen et al., 2012)<sup>63</sup>. Tendis, que dans d'autres pays tels que l'Union des Emirats Arabes, le Japon et le Canada, le type CTX-M-15 été en tête (Alfaresi et al., 2011<sup>64</sup>; Kanamori et al., 2011<sup>65</sup>;

<sup>56</sup> Baba Ahmed Z, Ayad A, Mesli E, Messai Y, Bakour R, Drissi M. (2012). CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. EMHJ • Vol. 18 No. 4.

<sup>57</sup> Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, Esmaily H, Nabavinia MS, Hoseini MD. (2012). The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Iranian J Bas Medical Scie. 1, 654-660.

<sup>58</sup> Lai CC, Wang CY, Chu CC, Tan CK, Lu CL, Lee YC, Huang YT, Lee PI, Hsueh PR. (2011). Correlation between antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria causing healthcare-associated infections at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2009. J Antimicrob Chemother. 66, 1374-1382.

<sup>59</sup> Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Kheder M, Ben Moussa M. (2012). Emergence of SHV-12 extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates of Enterobacter cloacae in Tunisia. Microb Pathogenesis. 53, 64-65.

<sup>60</sup> Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton MP, Kuli B, Lugagne-Delpon N, Mourlan C, Jaffar-Bandjee MC. (2010). Evolution de la résistance des Entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. Pathol Biol. 58,18-24.

<sup>61</sup> Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, Christophe de Champs. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, INT J ANTIMICROB AG 397-402.

<sup>62</sup> Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Med Maladies Infect. 42, 20-29.

<sup>63</sup> Parveen RM, Manivannan S, Harish BN, Parija SC. (2012). Study of CTX-M Type of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase among Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in South India. Indian J Microbiol. 52, 35-40.

<sup>64</sup> Alfaresi M S, Elkoush A A, Alshehhi H M, Abdulsalam A I. (2011). Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United Arab Emirates. Med Prin Pract, 20:177-180.

<sup>65</sup> Kanamori H, Navarro RB, Yano H, Sombrero LT, Capeding MRZ, Lupisan SP, Olvedab RM, Arai K, Kunishima H, Hirakatac Y, Kaku M. (2011). Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae from the Philippines. Acta Trop. 120, 140-145.

Denisuik et al., 2013<sup>66</sup>). De plus, de nouvelles  $\beta$ -lactamases de type SHV ont été retrouvées, il s'agit de SHV-98, SHV-99 et SHV-100 chez des *K. pneumoniae* isolées en Algérie (Ramdani-Bougoussa et al., 2011)<sup>67</sup>. Chez *E. cloacae*, plusieurs travaux réalisés en Taiwan et en Tunisie, notamment, ont décrit l'émergence de BLSE de type SHV-12 (Yang et al., 2012<sup>68</sup>; Lahlaoui et al., 2012<sup>69</sup>).

La souche de *K. pneumoniae* AK32 résistante à la céfoxitine et n'ayant pas présenté d'image de synergie avec le DD-test a été révélée productrice d'AmpC (Céphalosporinase) et ce par l'augmentation de la zone d'inhibition (5 mm) autour du disque de céfoxitine de 14 à 26 mm et autour du disque de céftazidime de 22 à 28 mm avec le test des disques combinés à l'acide boronique ainsi que par l'apparition d'une légère image de synergie entre le disque d'acide boronique et celui de la céfoxitine à une distance de 15 mm. Ces résultats indiquent également qu'entre les deux méthodes utilisant l'acide boronique comme inhibiteur de céphalosporinase, la technique des disques combinés et celle qui a donné de meilleurs résultats. La prévalence des souches de *K. pneumoniae* AmpC positive, en Algérie et en France, été de 1/211 des souches de *K. pneumoniae* isolées en Algérie et 2/324 des souches de *K. pneumoniae* isolées en France (Berrazeg et al., 2013)<sup>70</sup>. En revanche, des études ont montrées que la souche *K. pneumoniae* peut produire des BLSE et des AmpC en même temps (Bakthavatchalu et al. 2013<sup>71</sup> ; Fisher et al., 2009<sup>72</sup>).

L'enzyme de type céphalosporinase CMY-2 a été décrite, en Algérie, chez une seule souche de *K. pneumoniae* BLSE positive (Iabadene et al., 2009)<sup>73</sup>. Tandis que d'autres enzymes de type céphalosporinase ont été décrits dans d'autres pays tels que l'enzyme FOX en

<sup>66</sup> Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PRS, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Tailor F, Karlowsky JA, Hoban DJ, Adam HJ, Zhanel GG. (2013). Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC  $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007–11. J Antimicrob Chemother. 68, 57-65.

<sup>67</sup> Ramdani-Bougoussa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Canic M. (2011). Role of SHV  $\beta$ -lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to  $\beta$ -lactams in an Algerian hospital. J Med Microbiol. 60, 983–987.

<sup>68</sup> Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. (2012). Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. J Clin Microbiol. 50, 223-6.

<sup>69</sup> Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Kheder M, Ben Moussa M. (2012). Emergence of SHV-12 extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Tunisia. Microb Pathogenesis. 53, 64-65.

<sup>70</sup> Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, Rolain JM. (2013). Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS. PLOS ONE. Volume 8, Issue 4.

<sup>71</sup> Bakthavatchalu S, Shakthivel U, Mishra T. (2013). Detection of ESBL among ampc producing enterobacteriaceae using inhibitor-based method. PAMJ- ISSN. 1937- 8688.

<sup>72</sup> Fisher M A, Stamper P D, Hujer K M, Love Z, Croft A, Cohen S, Bonomo R A, Carroll K C, Petti C A. (2009) Performance of the Phoenix bacterial identification system compared with disc diffusion methods for identifying extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC and KPC producers. J Med Microbiol. 58, 774–778.

<sup>73</sup> Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, Arlet G. (2009). Prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. Int J Antimicrob Ag. 34, 340–342.

Espagne, en Argentine et en Italie, tandis que MOX a été signalé principalement au Japon et en France (Shanthi et al., 2012)<sup>74</sup>.

Les CMI de la ciprofloxacine de la souche AM de *K. pneumoniae* et des deux AK124 et Si1 souches d'*E. cloacae* étaient de 16, 32 et 256 µg/ml respectivement. Ces souches présentaient une résistance croisée pour l'acide nalidixique, pour la péfloxacine ainsi que pour la ciprofloxacine et qui correspondrait au mécanisme de résistance probable : 2 mutations dans *gyrA* et 1 mutation dans *parC* +/- imperméabilité. Ce phénotype est considéré comme le plus fréquent parmi les souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones (Soussy, 2006)<sup>75</sup>.

Une seule souche de *K. pneumoniae* (AK 32) BLSE<sup>-</sup> et AmpC<sup>+</sup> était intermédiaire à l'acide nalidixique et sensible à la ciprofloxacine. Il est probable que ce phénotype puisse correspondre à une imperméabilité membranaire et/ou à l'acquisition de gène *qnr* d'origine plasmidique. Ce dernier codant pour une protéine dite « Qnr » qui confère une résistance de bas niveau à l'acide nalidixique mais ne touchant pas les fluoroquinolones (Mammeri et al., 2005)<sup>76</sup>.

L'association de la production des céphalosporinase et des protéines Qnr peut être codée par le même gène plasmidique. Un cas d'étude établie en Mexique à rapporter que 55.8% des souches de *K. pneumoniae* et 50% des souches d'*E. cloacae* étaient productrices de BLSE, des protéines Qnr A, B et S ainsi que l'enzyme AAC(6')Ib-cr (Sanchez et al., 2011)<sup>77</sup>. Tandis qu'en Espagne, Tobes et al. (2013)<sup>78</sup> a rapporté qu'une souche de *K. pneumoniae* été porteuse de plasmide codant pour la céphalosporinase DHA-1 et la protéine QnrB4 ainsi que d'autres enzymes conférant une résistance à d'autres antibiotiques.

---

<sup>74</sup> Shanthi M, Sekar U, Arunagiri K, Sekar B. (2012). Detection of Amp C genes encoding for beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Indian J Med Microbiol. 3, 290-295.

<sup>75</sup> Soussy C-J. (2006). Phénotype de résistance aux quinolones chez les entérobactéries. 2<sup>ème</sup> édition. AntibioGramme. Paris VI. P263.

<sup>76</sup> Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. (2005). Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob Agents Chemoter. 71-76.

<sup>77</sup> Sanchez SJ, Barrios H, Flores RF, Diaz BM, Perez SA, Rojas T, Consortium RB, and Ramos GU. (2011). Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolates in Mexico. MDR, 17(4): 497-505.

<sup>78</sup> Tobes R, Codoñer FM, López-Camacho E, Salanueva IJ, Manrique M, Brozynska M, Gómez-Gil R, Martínez-Blanch JF, Álvarez-Tejado M, Pareja E, Mingorance J. (2013). Genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* KpQ3, a DHA-1  $\beta$ -lactamase-producing nosocomial isolate. genomeA.00167-12.

***Conclusion***

## CONCLUSION

---

Au terme de l'étude effectuée, en deux mois, au niveau des trois établissements publics hospitaliers de la wilaya de Béjaia: Akbou, Sidi Aich et Amizour, six souches de *Klebsiella pneumoniae* et deux souches d'*Enterobacter cloacae* ont été isolées et identifiées, dont la majorité d'entre-elles sont d'origine urinaire.

Parmi ces huit souches, 4 souches étaient multirésistantes dont une souche de *K. pneumoniae* et deux souches d'*E. Cloacae* étaient productrices de BLSE incluant des souches d'origine communautaire et nosocomiale et présentant une résistance de haut niveau pour la céftazidime avec des CMI allant de 16 à 256 µg/ml. Et une souche de *K. pneumoniae* productrice de céphalosporinase.

Le phénotype de résistance aux quinolones le plus fréquent (3 souches) est celui correspondant à la résistance à la fois à l'acide nalidixique, à la péfloxacinine et à la ciprofloxacine présentant une CMI pour la ciprofloxacine variable (de 2 à 64 µg/ml).

Une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un patient sous antibiothérapies (céfazoline et ciprofloxacine) s'est avérée multi-résistante. Ceci peut être dû à son exposition à une pression de sélection ou à un échec thérapeutique.

Par conséquent, l'émergence des souches multi-résistantes aux antibiotiques en milieu hospitalier reste un problème inquiétant de santé publique. Des mesures d'hygiène, des prescriptions d'antibiotiques ciblés et des consommations raisonnables de ces dernières sont recommandées afin de diminuer la transmission des souches bactériennes résistantes et de leurs pressions de sélection.

Cette étude reste préliminaire, elle doit être élargie sur plusieurs axes :

- Etablir une étude plus étendue par rapport aux lieux (dans d'autres hôpitaux au niveau du territoire nationale) et aux nombre de souches.
- Elargir la gamme d'antibiotique à tester afin de déterminer les phénotypes de résistance.
- Utiliser la biologie moléculaire afin de rechercher de nouveaux mécanismes de résistance.
- Effectuer une étude épidémiologique au niveau des hôpitaux afin de déterminer la transmission de résistance entre les espèces.

*Références  
bibliographiques*



### A

Alfaresi M S, Elkoush A A, Alshehhi H M, Abdulsalam A I. (2011). Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United Arab Emirates. *Med Prin Pract* , 20:177–180.

Amazian K, Rossello J, Castella A, Sekkat S, Terzaki S, Dhidah L, Abdelmoumène T, Fabry J. (2010). Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. *EMHJ*. 10, 1070-1078.

### B

Baba Ahmed Z, Ayad A, Mesli E, Messai Y, Bakour R, Drissi M. (2012). CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *EMHJ* • Vol. 18 No. 4.

Bakthavatchalu S, Shakthivel U, Mishra T. (2013). Detection of ESBL among ampc producing enterobacteriaceae using inhibitor-based method. *PAMJ- ISSN*. 1937- 8688.

Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton MP, Kuli B, Lugagne-Delpon N, Mourlan C, Jaffar-Bandjee MC. (2010). Evolution de la résistance des Entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. *Pathol Biol*. 58,18–24.

Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, Rolain JM. (2013). Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS. *PLOS ONE*. Volume 8, Issue 4.

Bonnet R. (2006).  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. 2<sup>ème</sup> édition. *Antibiogramme*. P141.

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 et 2007. *Med Maladies Infect*. 39, 142–143.

Bush K, Jacoby GA. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Agents Chemother*. 3, 969–976.

### C

Cano M E, Rodriguez-Martinez J M, Agüero J, Pascual A, Calvo J, Garcia-Lobo J M, Velasco C, Francia M V, Martínez-Martínez L. (2009). Detection of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J Clin Microbiol.* p. 2033–2039.

Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. (2004). Bêtalactamines Beta-lactam antibiotics. *EMC-Maladies Infectieuses.* 1, 129-202.

Charan J, Mulla S, Ryavanki S, Kantharia N. (2012). New Delhi Metallo- beta lactamase-1 containing Enterobacteriaceae: Origin,Diagnosis, Treatment and Public health concern. *PAMJ – ISSN: 1937- 8688.*

Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés A. (2001). SHV-1 -lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 10, 2856–2861.

Chen L, Chen Z-L, Liu J-H, Zeng Z-L, Ma J-Y and Jiang H-X. (2007). Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother.* 59, 880–885.

Comite De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie : Recommandations 2012. (Edition de Janvier 2012).

Comite De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie. (1995).

Norme n°2 : Méthode de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. Version 2.

### D

Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PRS, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Tailor F, Karlowsky JA, Hoban DJ, Adam HJ, Zhanel GG. (2013). Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC  $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007– 11. J Antimicrob Chemother. 68, 57-65.

### F

Fasquelle R. (1959). Elements de bactériologie médicale. 3<sup>ème</sup> édition : Médicales Flammarion. Paris-VI. 149p.

Fisher M A, Stamper P D, Hujer K M, Love Z, Croft A, Cohen S, Bonomo R A, Carroll K C, Petti C A. (2009) Performance of the Phoenix bacterial identification system compared with disc diffusion methods for identifying extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC and KPC producers. J Med Microbiol. 58, 774–778.

### G

Gauzit R. (2011). Actualités en antibiothérapie-Aminosides toujours et encore : bon usage et suivi thérapeutique. Réanimation. S1-S9.

Grall N, Andremont A, Armand-Lefèvre L. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ?. J Anti-infect. 16.

### H

Hæggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. (2004). Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*. Agents Chemother. 7, 2400–2408.

Hart T et Shears P. (1997). Atlas de poche de microbiologie. 1<sup>er</sup> édition. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. P71.

Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Woodford N, Gonzalez-Zorn B. (2013). Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. J Antimicrob Chemother. 68 (7): 1543-1550.

### I

Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, Arlet G. (2009). Prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Ag.* 34, 340–342.

### J

Jacoby GA. (2009). AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol*, 161–182.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G et Philippon A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Infect Dis.* 10, 867-878.

Jeong H S, Bae I K, Shin J H, Jung H J, Kim S H, Lee J Y, Oh S H, Kim H R, M.D, Chang C L, Kho W G, M.D, Lee J N. (2011). Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*. *Korean. J Lab Med.* 31(4): 257–264.

### K

Kanamori H, Navarro RB, Yano H, Sombrero LT, Capeding MRZ, Lupisan SP, Olvedab RM, Arai K, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M. (2011). Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae from the Philippines. *Acta Trop.* 120, 140-145.

Kanamori H., Yano H., Hirakata Y, Hirotsu A, Arai K, Endo S, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Gu Y, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Kaku M. (2012). Molecular Characteristics of Extended-Spectrum Beta-Lactamases and qnr Determinants in Enterobacter Species from Japan. *Plos One*, Volume 7, Issue 6, 37967.

Kuga A, Okamoto R, Matsuhisa Inoue. (2000). ampR Gene Mutation That Greatly Increase Class C  $\beta$ -Lactamase Activity in Enterobacter Cloacae. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 561.

### ℒ

Lai CC, Wang CY, Chu CC, Tan CK, Lu CL, Lee YC, Huang YT, Lee PI, Hsueh PR. (2011). Correlation between antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria causing healthcare-associated infections at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2009. *J Antimicrob Chemother.* 66, 1374-1382.

Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Kheder M, Ben Moussa M. (2012). Emergence of SHV-12 extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Tunisia. *Microb Pathogenesis.* 53, 64-65.

Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. (2001). Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 48, 87-102.

Livermore DM, Woodford N. (2006). Theb-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *TRENDS MICROBIOL.* 9, 414-420.

### ℳ

Maalej SM, Meziou MR, Mahjoubi F, Hammami A. (2012). Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistance to colistin in Sfax (Tunisia). *Med Maladies Infect.* 42, 256–263.

Madigan M. T et Martinkon J.M. (2007). *Brock Biologie des micro-organismes.* 11<sup>ème</sup> édition. Pearson Education France. P840.

Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. (2005). Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemoter.* 71–76.

Maraki S, Samonis G, Karageorgopoulos DE, Mavros MN, Kofteridis D, Falagas ME. (2012). In Vitro Antimicrobial Susceptibility to Isepamicin of 6,296 *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates Collected at a Tertiary Care University Hospital in Greece. *Antimicrob Agents Chemoter.* 6, 3067-3073.

## Référence bibliographique

---

Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Gros Claude JD P, Timinouni M. (2011). Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. Pathol Biol 59, 73-78.

Mousterdier G. (1972). Bactériologie medical. 4<sup>ème</sup> edition. ParisVI. P 250.

### N

Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Med Maladies Infect. 42, 20–29.

### P

Parveen RM, Manivannan S, Harish BN, Parija SC. (2012). Study of CTX-M Type of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase among Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in South India. Indian J Microbiol. 52, 35-40.

Pagès J-M. (2004). Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. M/S, vol. 20, N° 3, p. 346-351.

Philippon A, Arlet G. (2006).  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin. 64, 37-51.

Podschun R, Ullmann U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol. 4, 589-603.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. (2010). Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1, 24–38.

### R

Ramdani-Bougoussa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Canic M. (2011). Role of SHV b-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumonia* strains to b-lactams in an Algerian hospital. J Med Microbiol. 60, 983–987.

Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R. (2010). Novel VIM Metallo- -Lactamase Variant from Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. ANTIMICROB AGENTS CH, p. 466–470.

### S

Sanchez SJ, Barrios H, Flores RF, Diaz BM, Perez SA, Rojas T, Consortium RB, and Ramos GU. (2011). Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolates in Mexico. MDR, 17(4): 497-505.

Sanders WE JR, Sanders AC. (1997). Enterobacter spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. Clin Microbiol. 2, 220–241.

Shanthi M, Sekar U, Arunagiri K, Sekar B. (2012). Detection of Amp C genes encoding for beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. Indian J Med Microbiol. 3, 290-295.

Soussy C-J. (2006). Phénotype de résistance aux quinolones chez les entérobactéries. 2<sup>ème</sup> édition. Antibiogramme. Paris VI. P263.

Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. Clin Microbiol. 4, 664–689.

Su W.-Y, Gottlieb T, Merlino J. (2012). Optimal phenotypic testing of AmpC beta-lactamases using boronic acid solutions. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:49–51

### T

Thomson KS. (2010). Extended-Spectrum-  $\beta$ -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J Clin Microbiol.* 4, 1019–1025.

Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, Christophe de Champs. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, *INT J ANTIMICROB AG* 397–402.

Tobes R, Codoñer FM, López-Camacho E, Salanueva IJ, Manrique M, Brozynska M, Gómez-Gil R, Martínez-Blanch JF, Álvarez-Tejado M, Pareja E, Mingorance J. (2013). Genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* KpQ3, a DHA-1  $\beta$ -lactamase-producing nosocomial isolate. *genomeA*.00167-12.

### Y

Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. (2012). Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J Clin Microbiol.* 50, 223-6.

Yong D, Toleman M.A, Giske C.G, Cho H.S, Sundman K, Lee K,1 and Walsh T. R. (2009). Characterization of a New Metallo-  $\beta$ -Lactamase Gene, *bla*NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *ANTIMICROB AGENTS CH.* 5046–5054.

### Z

Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, Esmaily H, Nabavinia MS, Hoseini MD. (2012). The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iranian J Bas Medical Scie.* 1, 654-660.



# *Annexes*

## ANNEXES

---

- **Annexe I**

• <b>FICHE DE RENSEIGNEMENT</b>
---------------------------------

CODE : ..... Hôpital : .....

Age : ..... Sexe : M/F

Date du prélèvement : ..... Nature du prélèvement : .....

Hospitalisation : OUI/NON Service : .....

Antibiothérapie : OUI/NON Antibiotique administré : .....

Cas particulier : .....

Souche identifiée : .....

<b>Antibiogramme</b>				
<b>Antibiotiques</b>	<b>Charge (µg)</b>	<b>Diamètre (mm)</b>	<b>D<sup>min</sup> - D<sup>max</sup></b>	<b>Résultats (R/I/S)</b>

**Remarque sur l'antibiogramme :**

.....  
.....  
.....  
.....

# ANNEXES

## • Annexe II

Procédure à suivre pour effectuer la galerie API 20<sup>E</sup>

- On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartit environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide puis on place la galerie dans la boîte d'incubation.
- On préleve une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé d'une culture jeune (18-24h) afin de préparer la suspension bactérienne.
- On remplit les **tubes et cupules** des tests **CIT**, **VP**, et **GEL** avec la suspension bactérienne pour les autres tests on remplit seulement les tubes (et non les cupules).
- on crée une atmosphère anaérobie en remplissant les cupules : **ADH**, **LDC**, **ODC**, **H<sub>2</sub>S**, **URE** d'huile de paraffine.
- On referme la boîte d'incubation puis on incube à 37°C pendant 24h.
- Si 3 tests ou plus sont positifs, on note sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées puis on révèle les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, VP, Indole et NO<sub>2</sub>).
- Le test d'oxydase constitue le 21<sup>ème</sup> test d'identification qu'on note sur la fiche des résultats.
- Si le nombre de test positifs avant ajout des réactifs est inférieur à 3, on réincube la galerie 24h ± 2h sans rajouter les réactifs. Après la seconde incubation, on révèle les tests nécessitant l'addition des réactifs.
- Le logiciel API DENT a permis d'identifier les deux genres recherchés.

The image shows a BIOMÉRIEUX API 20E result card. At the top left is the logo 'api 20E' and a CE mark. To the right is a 'REF:' field with a barcode. Below this is a box for 'Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Πρωτότυπο / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie'. The main part of the card is a grid of 21 test wells, each with a number (1, 2, or 4) and a label. The tests are: ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, URE, TDA, IND, VP, GEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA, OX, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, MOB, MeC, OF-D, and OF-F. Below the grid are two boxes: 'Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy' and 'Ident. / Ταυτοποίηση:'. The card is printed on a light blue background.

Fiche de résultat de la galerie API20E

- **Annexe III**

### Composition des milieux de cultures (g/l) (Guiraud, 2003)

#### **Gélose Mac Conky**

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de viande.....	03g
Lactose.....	10g
Mélange de sels biliaires.....	1,5g
Chlorure de sodium.....	05g
Rouge neutre.....	0,03g
Cristal violet.....	0,001g

#### **Gélose Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf .....	300mg
Hydrolysat de caséine.....	17,5g
Amidon .....	1,5g
Agar.....	17g

- **Annexe IV**

**Contrôle de l'inoculum (standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine, 2011)**

- L'étalon 0,5 McFarland, se prépare en versant 0,5ml d'une solution BaCl<sub>2</sub>dihydraté à 1% (10g/l), dans une éprouvette de 100 ml. Compléter à 100 ml avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 % (10 ml/l). Ainsi préparé, l'étalon doit présenter une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm.
- Aliquoter la solution en volume de 10ml, dans des tubes identiques à ce qui servira à la préparation des inoculums (le nombre d'aliquote sera fonction du nombre de manipulateurs).
- Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (parafilm, ruban adhésif,...).
- Repérer le niveau du liquide à l'aide d'un marqueur, et le contrôler régulièrement en prenant la densité optique
- Conserver les tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière (papier aluminium).
- Il faut homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé : Inoculum et étalon doivent avoir la même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé.

- Annexe V

**Tableau N°II : Concentrations critiques et diamètres (mm) des zones et édités par le CFA-SFM, 2012.**

Antibiotiques	Abréviation	Concentration critiques (mg/l)		diamètres (mm) des zones	
		S	R	S	R
Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	4/8	8/8	21	< 16
Céfoxitine	FOX	8	32	22	< 15
Céfotaxime	CTX	1	2	26	< 23
Céftazidime	CAZ	<b>1</b>	<b>4</b>	26	< 21
Céftriaxone	CTR	1	2	26	< 23
Céfépime	FEP	1	4	24	< 21
Aztréonam	ATM	1	8	27	< 21
Acide nalidixique	NA	8	16	20	< 15
Ciprofloxacine	CIP	<b>0.5</b>	<b>1</b>	25	< 22
Ofloxacine	OFX	0.5	1	25	< 22
Perfloxacine	PEF	1	4	22	< 16
Gentamicine	GEN	2	4	18	< 16
Tobramycine	TOB	2	4	18	< 16
Cotrimoxazol	COT	2/38	4/76	16	< 13
Colestine	CL	2	2	15	< 15
Chloramphénicole	C	8	8	23	< 23
Tétracycline	TE	4	8	21	< 19

## ANNEXES

- Annexe VI

### Résultat de la galerie API20E



*Enterobacter cloacae*



*Klebsiella pneumoniae*

- **Annexe VII**

### Réactifs utilisés

#### Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isoamylique.....	150ml
P.diméthylaminobenzaldehyde.....	10g
Acide chlorhydrique concentré.....	50ml

#### Réactif de TDA (tryptophane désaminase)

Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$ .....	10ml
Eau distillée.....	20ml

#### Réactif de Voges-Proskauer (VPI)

Naphtol.....	6g
Alcool éthylique à 90°.....	100ml

#### Réactif de Voges-Proskauer (VPII)

NaOH4N

#### Rouge de méthyle (RM)

Rouge de méthyle.....	0,5g
Alcool éthylique à 60°.....	100ml

#### Réactif de Griess I (NRI)

Acide parasulfanilique.....	8g
Acide acétique 5N.....	1L

#### Réactif de Griess II (NRII)

Naphtylamine.....	6g
Acide acétique 5N.....	1L



## ***Résumé***

L'objectif de cette étude était d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter cloacae* isolées à partir de prélèvements pathologiques au niveau de trois établissements publics hospitalier de la Wilaya de Béjaia : Akbou, Sidi Aich et Amizour.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été effectués par la méthode de diffusion et de dilution sur milieu solide. La recherche des BLSE a été réalisée par le DD-test et la recherche des AmpC a été établie par le test à l'acide boronique.

Au total, 6 souches de *K. pneumoniae* et 2 souches d'*E. cloacae* ont été isolées et identifiées. 4 souches étaient multirésistantes aux antibiotique (2 souche de *K. pneumoniae* et 2 souches d'*E. cloacae*). 3 souches étaient BLSE positives (1 souche de *K. pneumoniae* et 2 souches d'*E. cloacae*) et 1 souche de *K. pneumoniae* était AmpC positive.

**Mot clés :** Résistance, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, Prélèvements pathologiques, Hôpital.

## ***Abstract***

The aim of this study was to evaluate the antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolated from pathological samples at three public hospital establishments of the city of Bejaia: Akbou, Sidi Aich and Amizour.

The antibiotic susceptibility testing was performed by the method of diffusion and dilution on solid agar. Research for ESBL was performed by the DD-test and research for AmpC was established by testing the boronic acid.

In total, six strains of *K. pneumoniae* and two strains of *E. cloacae* were isolated and identified. Four strains were multiresistant antibiotics (2 strain of *K. pneumoniae* and two strains of *E. cloacae*). 3 strains were ESBL positive (one strain of *K. pneumoniae* and two strains of *E. cloacae*) and one strain of *K. pneumoniae* was positive AmpC.

**Keyword:** Resistance, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, pathological samples, Hospital.