

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA de BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



Mémoire de Fin de Cycle

*En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie
Option Microbiologie Moléculaire et Médicale*

Thème :
**Caractérisation des phénotypes de résistance aux
 β -lactamines des souches d'*A. baumannii* isolées
au niveau de l'Hôpital de Ain Naadja**

Présenté par:

M^r MILANE Riad

M^r KARA Boualem

Membres de jury:

Présidente : M^{me} MEZHOUD H Doctorante

Promoteur : M^r TIOUIT .DJ Professeur

Co- promoteur: Dr TOUATI . A MCA

Examineur : M^r BAKOUR. S Doctorant

Examineur : M^r BELMAHDI. M MAB

Promotion 2012/2013

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le dieu le tout puissant pour avoir guidé pendant la durée de réalisation de notre mémoire du fin de cycle.

Nous tenons à remercier notre promoteur, le professeur Dj. TIOUIT pour nous avoir encadré et promulgué de rigoureux conseils tout au long de notre travail.

Nous remercions également Mr A. TOUATI et Mr S. BAKOUR pour leur disponibilité et leur conseil pratique qui nous ont beaucoup aidé et orienté dans notre recherche.

Nous tenons à remercier également tout le personnel de l'hôpital de Ain naadja (Alger), en particulier le chef de service du laboratoire Générale Naim qui nous ont permis de réaliser notre étude au sein de cet établissement dans de très bonnes conditions.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- **En premier lieu à mes très chers parents, pour leurs soutien, leurs encouragements, leurs sacrifices, eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'étude vers le chemin de la réussite**
- **A mes sœurs : Nadira, Wahiba, Nasira et Sabrina**
- **A mes frères : Nadir, Sofiane, Fares et Samir**
- **A toute ma famille**
- **A tous mes amis**
- **Et à toute la promotion Microbiologie moléculaire et Médicale promotion 2012/2013, à qui je souhaite un bon parcours professionnel.**

MILANE Riad

Dédicaces

Je dédie ce travail :

- **En premier lieu à mes très chers parents, ma famille et amis pour leur soutien, leur encouragements, leur sacrifices, eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'étude vers le chemin de la réussite.**

KARA Boualem

Liste des abréviations

ARI : Acinetobacter résistant à l' imipénème

ATM : Aztréonam

AN: Acide nalidixique

BMR: Bactérie multi-résistante

BLSE: β -lactamase à spectre étendu (élargi)

CARB: Carbénicilline

CAZ: Céfotazidime

CIP: Ciprofloxacine

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CLOXA : Cloxacilline

CLSI: Clinical laboratory standards institute

DO: Doxycycline

ECBU: Examen cytbactériologique des urines

EDTA: Ethylène Diamine tétra-acétate

GOB : Gynéco-obstétrique

GN: Gélose nutritive

Hyper : Hyperproduction

I : Intermédiaire

IMP: Imipénème

IS : Insertion sequence

MBL: Métallo- β lactamase

MH: Mueller Hinton

OXA: Oxacillinase

PHT :Service pneumo phtisiologie

PDP : Prélèvement distal protégé

PIP: Pipéracilline

Liste des abréviations

PLP: Protéine liant pénicillin

R : Résistant

RA: Rifampicine

S : Sensible

SXT: Triméthoprim +sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)

TIC: Ticarcilline

TCC: Ticarcilline-acide clavulanique

TEM: Nom du malade (Temoniera)

TOB: Tobramycine

TSI: Three Sugar Iron

PER: Pseudomonas extended resistant

VIM: Verona integron-encoded MBL

Liste des tableaux

N°	Titres	Page
I	Répartition des souches d' <i>A. baumannii</i> selon les services	14
II	Résultats du test de Hodge modifié	15
III	Comparaison des CMI des souches d' <i>A. baumannii</i> sur MH+IMP avec et sans NaCl	16
IV	Résultats du test à l'EDTA	17
V	Résultats de DDtest	18
VI	Résultats d'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines	20

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

Partie I : MATERIEL ET METHODES

1- Lieu et durée du stage.....	7
2- Méthodes.....	7
2-1 Prélèvements et isolement.....	7
2-2 purifications.....	7
2-3 Identification du genre <i>Acinetobacter</i>	7
2-4 Identification de l'espèce <i>A. baumannii</i>	8
3-Tests de sensibilité des souches d' <i>A. baumannii</i> aux antibiotiques.....	8
4 - Tests de détection des carbapénèmases	8
4-1 Test de Hodge modifié	8
4-2 Test à l'EDTA	9
4-3Test de synergie : IMP-EDTA	10
4-4 Détermination des CMI en milieu solide	10
5-Détection des BLSE.....	11

Partie II: Résultats et discussion

1-Résultats.....	14
1-1 Taux de l' <i>Acinetobacter</i> sp par rapport au total des bactéries isolées chez les patients hospitalisés...	13
1-2 Taux de l' <i>Acinetobacter baumannii</i> dans le genre d' <i>Acinetobacter</i>	13

Sommaire

1-3 Répartitions des souches d' <i>A. baumannii</i> selon les services.....	13
1-4 Répartition des souches d' <i>A. baumannii</i> selon le type du prélèvement.....	13
1-5 Résistances des souches d' <i>A. baumannii</i> aux β - lactamines	14
1-6 Résultats de DD test.....	17
1-7 Résultats d'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines	20
1-8 Résistances associées (Autres antibiotiques).....	21
 Discussion	 22
 CONCLUSION	 25
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 26
 ANNEXES	



Introduction

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste un problème majeur de santé publique, la situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (Soussy, 2007). La détection de cette résistance permet de prévenir et de ralentir la diffusion de souches multi-résistantes et d'optimiser le choix de l'antibiothérapie. (Lepape, 2007).

Acinetobacter baumannii est une bactérie ubiquitaire ayant pour principal habitat le sol, les eaux, les végétaux et les animaux, chez l'homme elle peut coloniser la peau, les plaies et les tractus aérien et digestif. C'est un germe pathogène opportuniste qui appartient à la famille des *Moraxellaceae* et considéré comme l'espèce la plus fréquemment identifiée dans les infections liées aux soins dans les services accueillant des patients fragilisés (Bergogne et Towner, 1996).

A l'examen direct, *A. baumannii* se présente comme des bacilles ou des coccobacilles à Gram négatif souvent associés par deux. Il est aérobic strict exigeant, se cultive sur les milieux usuels, en atmosphère aérobic à 35°C alors qu'une température de 44°C permet classiquement l'isolement sélectif de l'espèce *A. baumannii* (Bouvet et al., 2000).

Depuis une trentaine d'années, *A. baumannii* se caractérise par la vitesse à laquelle il accumule les multi-résistances par différents mécanismes. IL est considéré comme une bactérie multi-résistante. Cette bactérie est passé d'une sensibilité à la plupart des antibactériens à une résistance quasi-totale, ce qui a engendré parallèlement une augmentation de la consommation d'antibiotiques. (Van Looveren et Goossens, 2004).

Les *Acinetobacter* sont largement présents dans l'environnement, à partir de cet important réservoir de germes, l'homme peut être facilement contaminé ou transitoirement colonisé. Les facteurs prédisposant à l'éclosion d'une véritable infection sont surtout observés chez des patients hospitalisés : infection sous-jacente sévère ou intervention chirurgicale récente, gestes de réanimation médicale (pose de cathéters, sondes diverses) et antibiothérapie à large spectre. De plus en milieu hospitalier, les *Acinetobacter* peuvent même être isolés à partir de matériels à usage médical ou chirurgical. Des épidémies

hospitalières sont parfois observées en cas de contaminations, d'humidification de l'air d'appareil d'assistance respiratoire. (Avril et *al.*, 2000 ; Berche et Gaillard , 1988).

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames est caractérisée par la présence constante du cycle bêta-lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (Cavallo et *al.*, 2004). Les β -lactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne, leurs cibles sont des PLP (protéines liant pénicilline) qui interviennent dans la synthèse et le recyclage du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne (Tipper, 1985).

La classification moléculaire proposée par Ambler divise aussi les β -lactamases en quatre groupes (A à D), qui présentent des différences sur le plan phylogénétique. Les β -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, c'est-à-dire qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acétylation au cours de l'hydrolyse des β -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallobetamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques (Bush et *al.*, 1995).

A. baumannii est naturellement résistant à plusieurs β -lactamines du fait de l'association de différents mécanismes impliquant β -lactamases, efflux et imperméabilité. *A.baumannii* produit naturellement deux types de β -lactamases, une céphalosporinase ou β -lactamase de la classe C d'Ambler (également dénommée AmpC) et une oxacillinase ou β -lactamase de classe D. La production d'une céphalosporinase est à l'origine de la résistance naturelle de cette espèce aux aminopénicillines, à la céfalotine et à la céfoxitine (mais pas au sulbactam) . L'expression de gène *bla_{ampC}* chez *A. baumannii* est due à l'insertion d'une séquence ISAbal au niveau de ce gène et par conséquent générer une résistance plus étendue affectant en particulier la ceftazidime. Le gène codant l'enzyme AmpC est alors surexprimé et non pas déréprimé (Bou et Martinez, 2000).

D'autre part, la production naturelle d'une oxacillinase chez *A. baumannii* a été identifiée (Héritier et *al.*,2005). L'identification d'un gène chromosomique codant pour une oxacillinase appelée OXA-69/51. L'analyse de l'environnement génétique de *bla_{OXA-69}* n'a pas identifié d'éléments de type intégron/transposon susceptible d'expliquer l'acquisition de ce gène. L'analyse biochimique a montré que le spectre de substrat de cette oxacillinase est

limité à quelques β -lactamines (pénicillines, céfalotine, oxacilline) mais comprenait également l'imipénème et le méropénème dans une plus faible mesure, classant cette enzyme parmi les oxacillinasés aux propriétés de carbapénémases. Cependant, le niveau d'expression de ce gène serait extrêmement faible naturellement et la production de cette enzyme n'a que très peu de répercussion sur la résistance aux β -lactamines, y compris aux carbapénèmes (Héritier et al., 2005). L'expression de ce gène pourrait cependant être significativement augmentée par l'apport ou la modification de ses séquences promotrices et ainsi conduire à une surexpression de cette oxacillinasé : la répercussion serait alors beaucoup plus importante sur le phénotype de résistance. (Brown et al., 2005).

L'imperméabilité semble constituer chez *A. baumannii* un facteur également important dans la résistance aux β -lactamines, et en particulier aux carbapénèmes. La perméabilité naturelle d'*A. baumannii* aux carbapénèmes était de l'ordre de 1-2 % de celle de *Escherichia coli*. L'absence naturelle de sensibilité d'*A. baumannii* à certaines β -lactamines résulterait vraisemblablement d'une association de mécanismes incluant une taille réduite des protéines de membrane externe et une production limitée de porines. Comme c'est souvent le cas chez les bacilles à Gram négatif, les modifications de PLPs ont un rôle mineur dans la résistance acquise aux β -lactamines. (Sato et al., 1991)

La description de résistances acquises aux pénicillines a été rapportée dès le début des années 1980 avec l'identification de la pénicillinasé TEM-1 (Goldstein et al., 1983) puis du variant TEM-2 (Devaud et al., 1982).

Comme indiqué plus haut, *A. baumannii* produit naturellement une enzyme de type AmpC responsable de la résistance à plusieurs β -lactamines. Le phénotype dit "surexprimé" est fréquemment observé et le mécanisme sous-jacent n'a été que très récemment étudié. La présence d'une séquence d'insertion (IS) appelée IS *Aba1* en amont du gène codant pour cette céphalosporinasé est en fait lié à cette surexpression. Cette surexpression s'explique par le fait qu'en étant positionnée à quelques bases seulement du codon d'initiation du gène *bla_{ampC}*, IS *Aba1* apporte des séquences reconnues comme promotrices qui permettent donc d'élever très significativement le niveau de production de l'enzyme ce qui se répercute sur le phénotype de résistance par une élévation importante des CMI des β -lactamines appartenant au spectre de substrat de cette enzyme (Corvecs et al., 2003 ; Segal et al., 2004).

Parmi les BLSE identifiées chez *A. baumannii*, PER-1 et VEB-1 sont les plus fréquemment identifiés (Vahaborgln et al., 1997). Dans ce cas le support génétique peut être chromosomique ou plasmidique, le gène *bla*PER-1 était localisé au sein d'une structure génétique de type transposon composite (Tn1213) composé de manière originale de deux IS très différentes encadrant le gène de β -lactamase et à l'origine de son acquisition (Poirel et al., 2005).

La résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* fait partie des résistances émergentes en milieu hospitalier qui doivent constituer un véritable signal d'alerte au même titre par exemple que la résistance aux céphalosporines de spectre large chez *Salmonella* Typhimurium (Richet et al., 2001). Il existe deux types de carbapénémases capables d'hydrolyser les carbapénèmes qui ont été rapportées chez *A. baumannii*. Il s'agit d'une part des β -lactamases de la classe B de Ambler qui sont des métallob- β lactamases possédant un spectre de substrat très large et d'autre part des oxacillinases (ou β -lactamases de classe D), possédant un pouvoir hydrolytique faible vis-à-vis des carbapénèmes, épargnant les céphalosporines à large spectre et identifiées presque uniquement chez *A. baumannii* (Poirel et Nordmann, 2006).

Les métallob- β lactamases sont des β -lactamases non inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (comme l'acide clavulanique) et qui sont inhibées *in vitro* par l'EDTA. Celles identifiées chez *A. baumannii* sont du groupe IMP avec les variants IMP-1 (Corée du Sud, Japon, Italie), IMP-2 (Japon, Italie), IMP-4 (Hong-Kong), IMP-5 (Portugal), IMP-6 (Brésil) et IMP-11 (Japon) ou bien du groupe VIM avec les variantes VIM-1 (Italie) et VIM-2 (Corée du Sud) (Walsh et al., 2005). Ces enzymes confèrent un niveau élevé de résistance aux carbapénèmes, avec des CMI supérieures à 256 mg/l dans la plupart des cas. Ces carbapénémases sont codées par des gènes qui se situent la plupart du temps (si ce n'est systématiquement) au sein d'intégrons de classe 1, par conséquent très souvent associés avec des gènes codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, en particulier aux aminosides (Walsh et al., 2005).

La MBL décrite récemment, New Dalhy-1, a été détecté en 2010 chez une souche d'*A. baumannii* isolée en Inde et également été décrite en Allemagne, Belgique, Bangladesh, Chine et en République tchèque (Zarrilli et al., 2013).

Les oxacillinasés constituent au sein des β -lactamasés un groupe d'enzymes aux propriétés structurales et biochimiques extrêmement hétérogènes (Naas et Nordmann, 1999). Sept enzymes de type carbapénémases ont été mises en évidence dans des souches résistantes ou de sensibilité intermédiaire à l'imipénème. La première β -lactamase de ce type fut OXA- 23 (également appelée ARI-1) identifiée initialement en Écosse (Donald et *al.*, 2000) puis en France (Naas et Nordmann 1999) .

D'autres enzymes de ce type ont été rapportées (principalement en Europe) telles que OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA- 27, OXA-40 et OXA-58 qui ont la particularité d'hydrolyser l'imipénème significativement alors que leur spectre de substrat n'inclut pas la ceftazidime. L'hydrolyse du méropénème est variable d'une enzyme à l'autre. Ce spectre de substrat inhabituel pour une oxacillinasé s'accompagne d'une absence de sensibilité à l'action du NaCl à l'exception d'OXA-58, ce qui complique leur mise en évidence dans les laboratoires spécialisés (Poirel et Nordmann, 2006).

L'analyse du support génétique des gènes codant pour ces enzymes a montré une localisation chromosomique dans la plupart des cas mais une localisation plasmidique a été également démontrée pour les gènes codant les enzymes OXA-23 et OXA-58. Il s'agit de plasmides de haut poids moléculaires non-transférables par conjugaison. Ce type d'oxacillinasé semble avoir une répartition géographique très importante avec par exemple pour OXA-58 une identification en France, en Turquie, en Roumanie et en Espagne (Héritier et *al.*, 2005 ; Marques et *al.*, 2005). D'autre part, concernant l'environnement de ces gènes d'oxacillinasés, ils n'ont jamais été identifiés au sein de structures de type intégrons alors que ces mêmes structures sont paradoxalement à l'origine de la dissémination de la plupart des autres gènes d'oxacillinasés à spectre de substrat restreint. Dans le cas d'OXA-23, la séquence d'insertion *ISAbal* (qui appartient à la famille IS4) à l'origine de la surexpression de la céphalosporinasé naturelle d'*A. baumannii*, est présente en amont du gène de cette oxacillinasé, et contribue donc également à l'expression du gène *bla*_{OXA-23} et peut-être à son acquisition . Par la suite, l'OXA-23 a été rapportée chez une souche isolée au niveau du CHU de Annaba et qui renfermait à la fois le gène *bla*_{OXA-23} et le *bla*_{OXA-58} (Touati et *al.*, 2012). Bakour et *al.*, (2012) Ont également rapporté des souches d'*A. baumannii* en Algérie renfermant le gène *bla*_{OXA-23} associés ou non à *bla*_{OXA-72}. L'enzyme carbapénémase du type

OXA-72 a été déjà signalée dans la région Asie-Pacifique, en Europe et en Amérique du Sud, mais pas en Afrique du Nord (Bakour et *al.*, 2012).

Les enzymes OXA-58 sont le plus souvent identifiées en Amérique du Sud, la présence du gène bla_{OXA-58} a été observée chez d'autres souches issues d'autres pays d'Amérique latine et a été également trouvé en Europe (Zarrilli et *al.*, 2009). En Algérie, le gène bla_{OXA-58} a été rapporté pour la première fois en Algérie chez douze isolats cliniques d'*A. baumannii* isolés au niveau du CHU de Tlemcen (Drissi et *al.*, 2010).

D'autres enzymes de ce type ont été rapportées (principalement en Europe) telle que l'OXA-24, qui est identique à l'OXA-40 et ayant 60% d'homologie avec l'OXA-23 (Zarrilli et *al.*, 2013).

L'analyse du support génétique des gènes codant ces enzymes a montré une localisation chromosomique dans la plupart des cas mais une localisation plasmidique a été également démontré pour les gènes codant les enzymes OXA-23 et OXA-58 (Bakour et *al.*, 2012 et Touati et *al.*, 2012).

La résistance des souches d'*A. baumannii* aux β -lactamines et surtout aux carbapénèmes reste un problème majeur de santé public ainsi que la diffusion et la dissémination des bactéries multi-résistantes. C'est dans cette optique que nous proposons d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques ainsi que de caractériser les phénotypes de résistance aux β -lactamines chez des souches d'*A. baumannii* isolées au niveau de l'Hôpital Ain Naadja (Alger).



Matériel et méthodes

1-Lieu et durée du stage : Notre étude a été effectuée à l'Hôpital de Ain Naadja pendant 3 mois (06/03/2013 au 06/06/2013).

2 – Méthodes :

2-1 Prélèvements et isollements :

1832 prélèvements(pus, peau brulée, urine) sont effectués à l'aide de sondes, écouvillons et seringue et ensemence par la suite sur gélose nutritive puis incubés à 37°C pendant 24 h.

2-2 Purification :

Les colonies bactériennes sont ensuite purifiées, si nécessaire, par un ré isolement.

2-3 Identification du genre *Acinetobacter* :

➤ Examen microscopique (coloration de Gram) :

Cette coloration consiste à préparer un frotti sur une lame réalisé à partir des colonies prélevées sur gélose nutritive puis on effectue plusieurs colorations successives et on passe en dernier à l'observation microscopique à l'objectif $\times 100$ après l'ajout de l'huile d'immersion.

➤ Identification biochimique par la galerie API 20 NE :

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

➤ Test d'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé, on prend un disque d'oxydase et on ajoute le réactif puis on met une ou deux colonies sur le disque. Une réaction positive se traduit par une coloration violette en 2 minutes environ (Guillaume, 2004).

2-4 Identification de l'espèce *A. baumannii* :

Après purification des souches du genre d'*Acinetobacter*, on repique ces souches sur gélose nutritive (GN) puis on l'incube à 44C° pendant 24h.

3-Tests de sensibilité des souches d'*A. baumannii* aux antibiotiques :

❖ L'antibiogramme (Clinical laboratory standards institute, 2011)

L'antibiogramme a été réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé (MH), méthode recommandée par le CLSI.

• Préparation de l'inoculum :

- ✓ A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié après purification des souches , prélever à l'aide d'un écouvillon 2 à 3 colonies bien isolées et identiques.
- ✓ Décharger l'écouvillon dans 5 ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser la suspension bactérienne puis on mesure son opacité à l'aide d'un densitomètre et qui doit être équivalente à 0,5 MF ou à une densité de 0,08 à 0,1 à 625 nm.

• Ensemencement :

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- ✓ Ensemencer l'inoculum sur milieu Mueller Hinton (MH).
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de tourner l'écouvillon et de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ✓ Déposer 6 disques d'antibiotiques dans chaque boîte de 90 mm.
- ✓ Incuber les boîtes de pétri dans l'étuve à une température de 37C° pendant 24h.

4-Tests de détection des carbapénèmases :

4-1 Test de Hodge modifié

- ✓ **Principe de test :** Le principe de ce test est d'observer une distorsion de la zone d'inhibition autour de disque d'imipénème au contact de la souche à tester qui signifie la production des carbapénèmases.

✓ **Technique :**

- Ensemencer en culture à l'aide d'un écouvillon une dilution au 1/10^{ème} d'une suspension de Densité Optique (DO) = 0.5 Mc Farland de la souche *E. coli* ATCC 25922 sur une gélose Mueller Hinton.
- un disque d'imipénème chargé à 10 µg est déposé au centre de la boîte, ensemencer la souche de référence positive de *Klebsiella Pneumoniae* , souche de référence négative de *Klebsiella pneumoniae* et la souche testée d'une manière radiale à partir du disque jusqu'au bord de la boîte de Pétri, ensuite on incube les boites à 37C° pendant 18h. La présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif après incubation pendant 18 h à 37°C.(Anderson et *al.*, 2007 et Giske et *al.*, 2011).

4-2 Test à l'EDTA :

- ✓ **Principe :** Le principe de ce test est d'obtenir une augmentation de la zone d'inhibition autour de disque d'imipénème plus EDTA par rapport au disque imipénème seul qui conduit à l'inhibition de l'enzyme par l'EDTA.

✓ **Technique :**

- On réalise un antibiogramme standart.
- Déposer un disque d'imipénème (10ug) additionné de 4 ul d'une solution d'EDTA (0,5 M), ce dernier est déposé suffisamment distant d'un disque vierge contenant 4 ul de la solution d'EDTA, en présence également d'un disque d'imipénème seul comme témoin sur la même boite de pétri renfermant le milieu Mueller Hinton (Ait el Kadi et *al.*, 2006).
- Incubation à 37C° de 18 à 24 h, les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec les disques d'EDTA et d'IMP seuls d'au moins 6 mm sont considérées comme souches productrices des MBL (Yong et *al.*, 2002).

4-3 Test de synergie IMP-EDTA (Lee et al., 2000)

- ✓ **Principe :** Le principe de ce test est d'obtenir une image de synergie entre le disque vierge additionnée d'une solution d'EDTA (0,5 M) et le disque d'imipénème seul qui signifie la production des MBL par les souches testées.

- ✓ **Technique :**
 - Préparation de la suspension bactérienne de 0,5 Mac Farland.
 - Inoculer la suspension bactérienne sur milieu Mueller Hinton.
 - Déposer un disque vierge imprégné d'une solution d'EDTA de 0,5 M à distance de 15 mm de disque d'imipénème puis on incube à 37C° pendant 24h.

- ✓ **Lecture :** La présence d'une MBL est détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA.

4-4 Détermination des CMI de l'imipénème en milieu solide (Poirel et al., 2005)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices est réalisée en duplicata (sur MH, et MH + NaCl) en milieu solide, afin d'apprécier la réduction des CMI par le NaCl.

L'antibiotique testé est l'imipénème, la poudre de ce dernier est dissoute dans du tampon phosphate à 0,01 M, pH 7(Annexe IV).

❖ Préparation de la gamme d'antibiotique :

- On prépare une gamme d'antibiotiques (imipénème) pour différentes concentrations finales dans le milieu du 2 à 256ug /ml.

❖ Préparation des boîtes :

18 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont additionnés de 2 ml de chacune des différentes concentrations de l'imipénème déposés dans des boîtes de pétri. Les mêmes étapes ont été suivies, mais avec ajout de NaCl avec une concentration finale de 200mM.

❖ **Préparation de la suspension bactérienne :**

- Prélever quelques colonies bien isolées à partir de boîte de pétri et décharger bien dans l'eau physiologique.
- diluer la suspension bactérienne de $1/100^{\text{ème}}$ dans l'eau physiologique, en prendre 3 tubes remplir de 5ml d'eau physiologique.

❖ **Ensemencement :**

- On ensemence par spot ($10\text{ul} = 10^4 \text{ UFC/spot}$) de la suspension bactérienne diluée sur le milieu, en faisant la même opération pour toutes les concentrations finales d'antibiotique.
- Incubation à 37C° pendant 18 à 24h.

Il est à noter que le test d'oxacillinase est réalisé sur milieu Mueller Hinton + imipenème avec NaCl et sur milieu Mueller Hinton + imipenème sans NaCl.

- ✓ **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.

En remarque une diminution de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu contenant NaCl par rapport au milieu sans NaCl, ce qui explique la production d'oxacillinase par la souche.

5-Détection des BLSE (DDtest)

- ✓ **Objectif :** ce test fait l'objet de détection des β - lactamases à spectre élargi (BLSE) et les hyperproduction des céphalosporinases.

Il est à noter que ce test utilise la cloxacilline qui agit comme inhibiteur de β -lactamase de type ampC (Céphalosporinase).

✓ **Technique**

- Préparer la solution cloxacilline on dissoudre 25mg de cloxacilline (Poudre) dans 10ml d'eau distillée.
- On prend 2ml de la solution de cloxacilline et on verse dans 18 ml de MH pour chaque boîte de pétri.
- Déposer sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline à $250\mu\text{g} /\text{ml}$, préalablement ensemencé par la souche à tester, un disque de ceftazidim (CAZ),

céfépime (FEP), disque de ticarcilline + acide clavulanique (TCC) et un disque de l'Aztréonam (ATM) distancé de 1,5cm et en fait la même chose pour milieu Mueller Hinton sans cloxacilline, le test BLSE est interprété en comparant l'antibiogramme réalisé sur MH additionné de la cloxacilline à celui réalisé sur MH sans cloxacilline. Si BLSE est positive, la synergie est visible entre les disques CAZ, CTX, FEP, ATM et TCC.(CLSI, 2011).



Résultats

1-Résultats

1-1 Taux de l'*Acinetobacter* sp par rapport au total des bactéries isolées chez les patients hospitalisés :

Durant la période de 6 Mars au 20 Avril 2013, total de 1832 prélèvements effectuée, 25 sont des *Acinetobacter* sp soit 5,51%.

1-2 Taux de l'*Acinetobacter baumannii* dans le genre *Acinetobacter* sp :

L'ensemble (25 souches) des *Acinetobacter* isolées appartiennent à l'espèce *Acinetobacter baumannii*.

1-3 Répartitions des souches d'*A. baumannii* selon les services :

Comme on le voit sur la Figure ci-dessous (**Figure 1**) les fréquences élevé ont été retrouvées dans les services de réanimation et des brulés avec successivement 32% et 20% des cas.

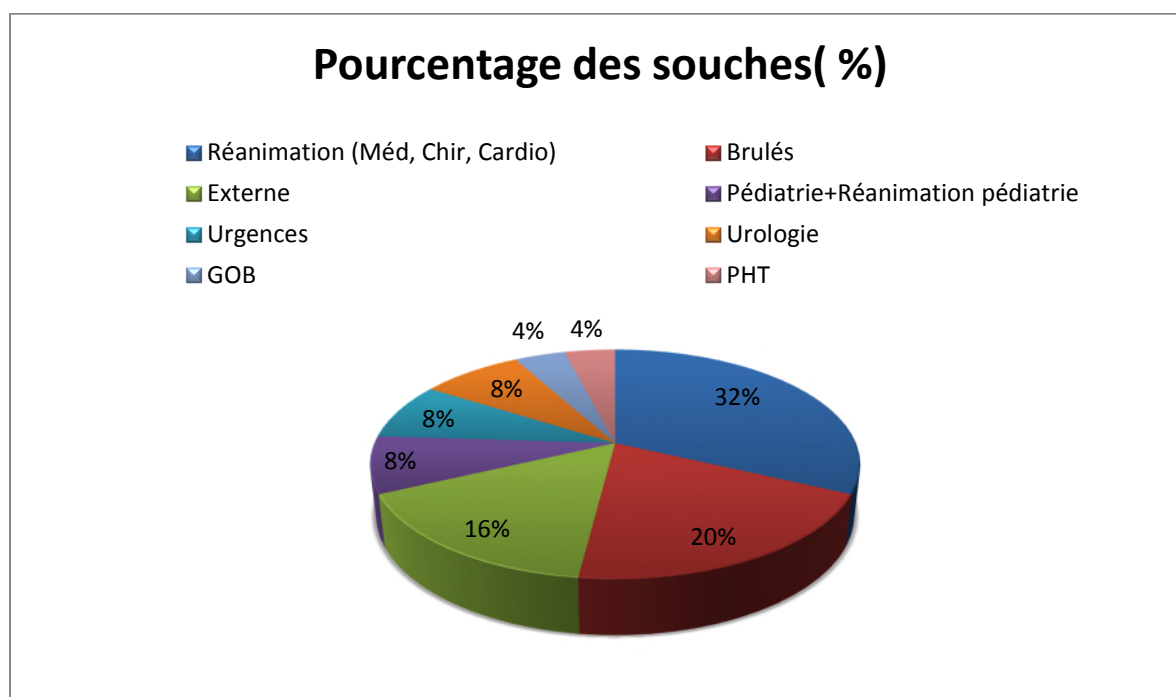


Figure 1 : Répartition des souches d'*A. baumannii* selon les services

1-4 Répartition des souches d'*A. baumannii* selon le type du prélèvement

Les résultats obtenus sont résumé dans le tableau I, la majorité des souches d'*A. baumannii* ont été isolées au niveau de PDP+Crachats.

Tableau I : Répartition des souches d'*A. baumannii* selon le type du prélèvement

Prélèvement	Effectif	Fréquence
Pus	6	24%
Crachat+PDP	8	32%
Cutané (brulures)	5	20%
Urines	6	24%
Total	25	100%

1-5 Résistance des souches *A. baumannii* aux β - lactamines :

Les résultats des antibiogrammes effectués sur les souches d'*A. baumannii* testées vis-à-vis de 5 β -lactamines(...) sont présentés dans la figure 2 ci dessous. On constate que la plupart de nos souches sont résistantes à ces molécules.

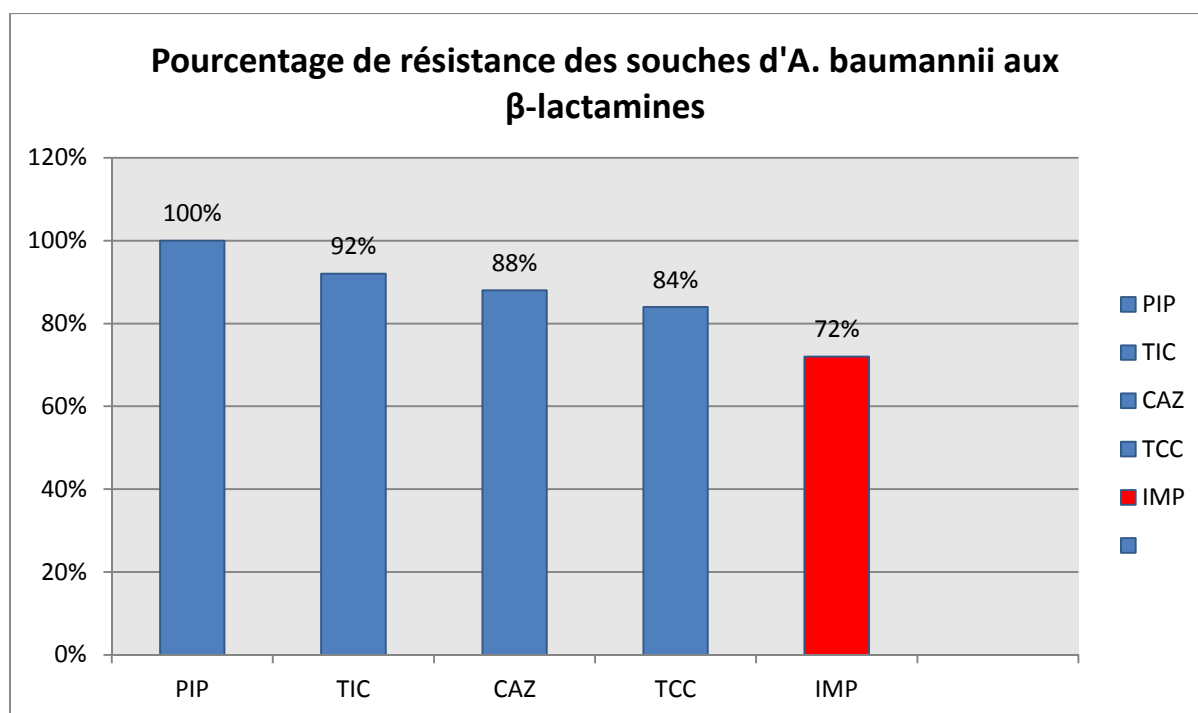


Figure 2 : Résistances d'*A. baumannii* aux β -lactamines testées(%)

❖ **Etude de la résistance à l'imipénème :**

Sur les 25 souches d'*A. baumannii* isolées, 18 sont résistantes à l'imipénème. Pour étudier cette résistance à l'imipénème, nous avons procédé les tests complémentaires suivants :

- **Détection des carbapénèmases**

- ✓ **Résultats du test de Hodge modifié :**

Le test est positif pour 14 souches d'*A. baumannii* sur 18 testés, ce qui explique la production des enzymes de type carbapénèmases par les souches testés (Tableau II).

Tableau II : Résultats du test de Hodge modifié

Numéro des souches	Test de Hodge
570	Positif
562	Positif
519	Positif
652	Positif
707	Positif
624	Positif
503	Négatif
533	Positif
502	Positif
950	Positif
690	Négatif
640	Négatif
532	Positif
699	Positif
697	Positif
679	Négatif
5454	Positif
787	Positif

- ✓ **Résultats du test d'oxacillinase :**

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III ci dessous, sur 25 souches d'*A. baumannii* isolées, 7 souches possèdent des oxacillinases.

Tableau III : Comparaison des CMI des souches d'*A. baumannii* sur milieu MH+IMP avec et sans NaCl

Nnbr des souches	Valeurs des CMI des souches d' <i>A. baumannii</i>	
	CMI (MH+IMP sans NaCl)	CMI sur milieu MH + IMP avec NaCl
483	≤32	≤32
679	>64	>64
5560	≤32	<32
5454	>64	≤32
570	>128	>32
503	>64	≤32
697	>64	≤32
707	>128	<32
5926	≤32	≤32
5860	≤32	≤32
624	>128	<32
4545	>32	≤32
652	>64	>64
787	>64	>64
598	>32	>32
519	>32	>32
502	>32	>32
533	>64	>64
532	>64	<32
699	>32	≤32
562	>32	≤32
950	≤32	≤32
690	>32	>32
640	>32	>32
5556	≤32	≤32

- Détection des métallo-β lactamases :
- ✓ Résultats du test à l'EDTA : Comme c'est représenté dans le tableau IV ci-dessous, le test est positif pour 14 sur 18 souches d'*A. baumannii* testés.

Tableau IV : Résultats du test à l'EDTA

Nmbr de souche	EDTA	IMP+EDTA	D	IMP seul
570	6	13	7	<6
519	6	14	8	<6
624	6	13	7	<6
503	11	10	1	<6
533	8	14	6	<6
640	15	17	2	10
532	6	19	13	<6
699	6	12	6	7
679	9	17	8	12
787	6	13	7	<6
502	6	12	6	9
562	6	20	14	<6
652	9	19	10	<6
690	6	16	6	<6
697	12	15	3	<6
707	10	19	9	<6
950	16	14	-2	<6
5454	6	12	6	<6

✓ **Résultats du test de synergie (IMP-EDTA) :**

D'après les résultats qu'on a obtenus, aucune image de synergie n'a été observés pour toutes les souches qui ont été analysées.

1-6 Résultats de DDtest : Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau V** ci dessous, sur 25 souches testées, 17 souches d'*A. baumannii* sont hyperproductrices de céphalosporinases avec l'absence d'image de synergie (BLSE -) pour toutes nos souches.

Tableau V : Résultats de DDtest

Souches	679		652		532	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AVCLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	6	6	12	16	14	22
TCC	6	6	6	6	6	6
CAZ	6	6	6	15	6	18
CTX	6	6	6	12	6	16
ATM	14	15	12	13	12	18
Souches	690		5560		787	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	16	22	24	32	5	18
TCC	6	6	24	6	10	6
CAZ	6	20	20	26	6	14
CTX	6	16	20	28	6	12
ATM	14	18	15	21	6	13
Souches	624		570		598	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	24	24	12	18	10	16
TCC	19	19	6	6	15	18
CAZ	22	22	6	16	10	17
CTX	22	23	6	12	6	12
ATM	16	18	10	16	6	6
Souches	699		519		4545	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	16	20	15	20	24	30
TCC	6	6	6	6	6	6
CAZ	6	14	6	15	20	25
CTX	6	10	12	20	6	24
ATM	18	12	15	18	18	17

Souches	5556		5926		640	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	30	30	24	23	11	16
TCC	32	32	22	22	6	10
CAZ	25	25	19	19	12	18
CTX	24	24	17	17	6	9
ATM	21	21	13	13	6	7
Souches	502		697		483	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	18	26	20	12	11	13
TCC	14	18	14	17	12	12
CAZ	19	26	16	22	6	6
CTX	16	22	12	20	6	6
ATM	13	16	15	17	12	16
Souches	707		562		5860	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOX	SS CLOXA	AV CLOX	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	12	18	15	25	20	24
TCC	6	6	6	6	22	22
CAZ	6	16	6	22	18	20
CTX	6	14	6	20	16	20
ATM	14	15	14	16	6	8
Souches	533		5454		950	
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOX	SS CLOXA	AV CLOX	SS CLOXA	AV CLOXA
FEP	12	12	12	13	11	16
TCC	6	6	6	6	6	6
CAZ	6	6	9	11	16	23
CTX	6	6	6	6	15	22
ATM	6	6	8	6	12	15
Souches	503					
Cloxacilline (250ug/ml)	SS CLOXA	AV CLOXA				
	6	6				
	6	6				
	6	6				
	6	6				
	6	6				

1-7 Résultats d'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines :

Il est à noter d'après le tableau ci- dessous que 13/18 (72,22%) de nos souches sont hyperproductrices de céphalosporinase dont 2 d'entre elles sont associées avec d'autres mécanismes (imperméabilité ,efflux), 5 sont associées avec les métallo- β -lactamases, 4 sont associées avec l'oxacillinase et les MBL et 2 renferment uniquement l'yperproduction de céphalosporinase.

A ce qui est des souches résistantes à l'imipénème , 14/18 (66,66%) souches sont productrices des carbapénèmases : 14 possèdent des MBL dont 6 sont associées à des oxacillinases , et 8/18 renferment des MBL uniquement, reste 2 souches résistantes uniquement par autres mécanismes (efflux, imperméabilité....).

Tableau VI : Résultats d'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines

N° de souches	Test à l'EDTA	Test de Hodge	Test à l'NaCl	BLSE+ Hyperproduction D'AmpC	Phénotype de résistance probable
570	+	+	+	+	MBL+OXA+Hyper
562	+	+	-	+	MBL+Hyper
519	+	+	-	+	MBL+Hyper
652	+	+	-	+	MBL+Hyper
707	+	+	+	+	MBL+OXA+Hyper
624	+	+	+	-	MBL+OXA
503	-	-	+	-	Autres mécanismes
533	+	+	-	-	MBL
502	-	+	-	+	Autres mécanismes + Hyper
950	+	+	-	+	MBL+Hyper
690	+	-	-	+	MBL+Hyper
640	+	-	-	+	Hyper
532	+	+	+	+	MBL+OXA+Hyper
699	-	+	-	+	Autres mécanismes+Hyper
697	+	+	+	+	MBL+OXA+Hyper
679	-	-	-	-	Autres mécanismes
5454	+	+	+	-	MBL+OXA
787	+	+	-	+	MBL+Hyper

1-8 Résistances associés (autres antibiotiques) :

Concernant les autres familles d'antibiotiques testés, les résultats obtenus sont rapporté sur la figure ci-dessous (Figure 3).

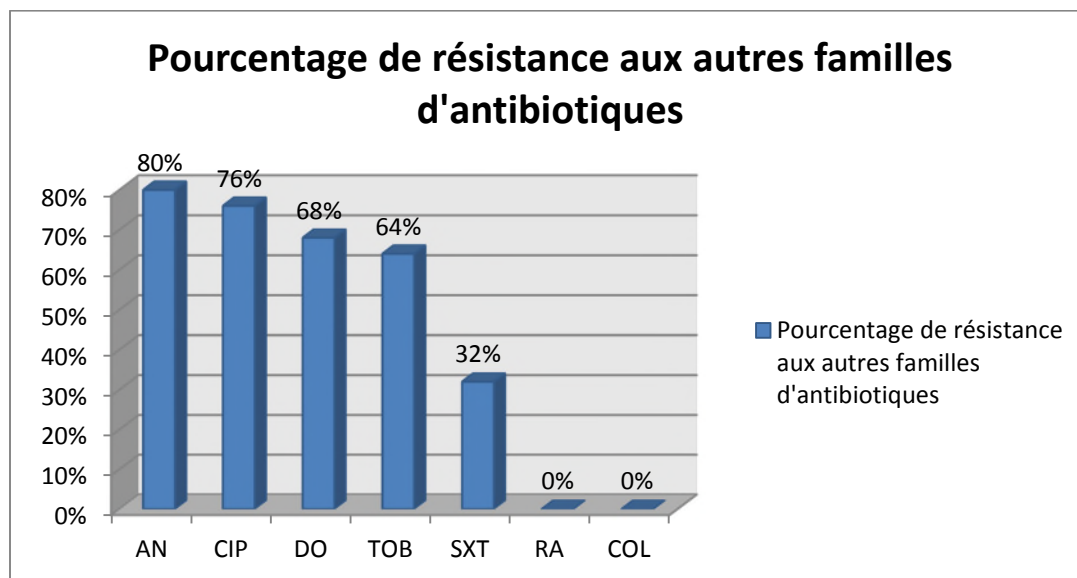


Figure 3 : Pourcentage de résistance des souches d'*A. baumannii* aux autres antibioti



Discussion

Cette étude est effectuée sur un collectif de 25 souches d'*A. baumannii* au niveau de l'Hôpital Ain Naadja (Alger). 32% des souches d'*A. baumannii* sont isolées à partir du service de réanimation. Nos résultats sont proches de celui rapportée par Liazid, (2012) avec un taux de 31%.

Dans l'étude rapportée par Benredouane et *al.*, (2012) le taux d'isolement le plus élevée d'*A. baumannii* provient des prélèvements respiratoire avec 31%, ce résultat est proche avec notre étude (32%) suivi des autres types de prélèvements. Les sources les plus courantes de ces bactériémies dues à *A. baumannii* sont les infections des voies respiratoires inférieure, les dispositifs intra vasculaires, les infections des plaies et des voies urinaires, ainsi que les patients immunodéprimés, et l'échec de l'antibiothérapie antérieure (McConnell et *al.*, 2013).

Dans notre étude, 100% des souches d'*Acinetobacter* sp isolées sont des *A. baumannii*, ce résultat reste supérieur à celui rapporté par Morbido, (2005) avec un taux de 28,6%.

Une étude rapporté par Yu-Chi, (2009) a montré que 70,66% des souches d'*A. baumannii* sur 100% des *Acinetobacter* sp sont isolées, on compare à nos résultats qui sont toujours supérieur avec un taux de 100%.

La résistance d'*A. baumannii* aux β - lactamines reste un cas inquiétant dans notre étude, on a obtenus des taux élevées de résistances : IMP (72%), CAZ (88%), compare a une récente étude faite au CHU de Batna avec des taux de résistances de : IMP (40%), CAZ (66%) (Kassah et *al.*, 2012).

Une étude rapportée par Amzian et *al.*, (2006), montre le pourcentage de la résistance de l'imipenème dans les différents pays d'Afrique qui atteint 5,2% en Algérie et 28,8% en Tunisie.

Dans notre étude, plus de 77,77% des souches d'*A. baumannii* sont productrices des carbapénèmases (test de Hodge positif), ce résultat reste très proche de celui obtenus par Ehlers (2012), qui atteint un taux de 74% et qui confirme l'activité carbapénèmase des souches d'*A. baumannii*. D'après l'étude faite par Fais, (2011) l'association du test de Hodge et du test IMP plus EDTA pouvant détecter 93% des carbapénèmases.

Concernant le test d'EDTA, au total de 18 souches d'*A. baumannii* résistante à l'imipénème, 14/18 souches présentent un Test d'EDTA positive (77,77%), ce résultat reste très supérieur à celui rapporté par Drongen et *al.*, (2002) avec un taux de 4,3%. A partir de ces résultats en confirme la présence des métallo- β lactamases produite par les souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipénème. Selon une étude faite par Huang, (2011), le test de d EDTA présente une sensibilité de 90% au métallo β - lactamase, comparé avec l'étude faite par Fais, (2011), avec 100% de sensibilité.

Dans notre étude, on a obtenus 68% des souches d'*A. baumannii* qui ont une hyperproduction de céphalosporinases, on compare avec les résultats rapporté par NCCLS, (2003) avec un taux de 33,33%. Cette hyperproduction est due à l'insertion d'une séquence ISAbal qui porte des séquences promotrice forte en amont du gène blaApmC qui code pour cette AmpC.

Dans notre étude, 7 sur 25(28%) souches d'*A. baumannii* sont des productrices d'oxacillinase avec des CMI plus importante (CMI de 64 ug/ml à 128ug/ml), on comparent au résultats obtenus rapporté par Mesli et *al.*, (2013) à l'hôpital de Tlemcen avec un taux de 82% (CMI de 64ug / ml à 512ug /ml). La présence de l'OXA-51 naturelle uniquement chez *A. baumannii* a été suggérée pour expliquer la résistance aux carbapénèmes et l'élévation des CMI de l'imipénème à 128ug/ml (Zarrilli et *al.*, 2013). Cette technique a besoin de différents techniques de biologie moléculaire pour identifie le type d'oxacillinases exprimées par nos souches résistantes à l'imipénème (OXA-23 ,24 ,58....).

La sensibilité à la colistine de nos souches peut être expliquée par le fait que cette molécule antibiotique n'est pas encore utilisée pour le traitement des infections à *A. baumannii* en Algérie , d'ailleurs elle est un peu délaissée en raison de sa néphrotoxicité et réservée juste pour le traitement des épidémies à *Salmonella Typhi* (Bouzenoune et *al.*, 2010).

Cependant, des isolats cliniques résistants à la colistine ont déjà été rapportés dans d'autre pays du monde. L'apparition de plus en plus de résistances hétérogènes pour cette classe d'antibiotiques est due à l'augmentation de l'usage de cette molécule en monothérapie pour le traitement des infections causées par les souches multirésistantes d'*A. baumannii* (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010 et Al-Sweih et *al.*, 2012).

La colistine a été utilisé comme une alternative de traitement en combinaison avec la rifampicine mais des résistances à cette dernière ont été rapporté d'où la nécessité urgent de développement et d'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques.



Conclusion

L'étude que nous avons réalisé au niveau de l'Hôpital de Ain Naadja, nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- 25 souches d'*A. baumannii* ont été isolées. Elles sont le plus souvent d'origine hospitalière (84%).
- Les souches d'*A. baumannii* ont été le plus fréquemment isolées du service de réanimation et brûlé (32%), (20%) respectivement.
- Toutes nos souches sont résistantes aux β -lactamines surtout à l'imipénème (18 souches) et qui cause un problème majeur de santé public.
- 14 souches d'*A. baumannii* sont productrices des MBL dont 6 sont associés à des oxacillinases et 8 renferment des MBL uniquement, 17 (68%) sont hyperproductrices de céphalosporinase.

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaire, ils doivent complétés par une série d'autres tests, plus performants, à savoir :

- Les techniques de biologie moléculaire qui confirmeront les phénotypes de résistance.
- L'identification et la caractérisation de l'environnement génétiques
- Etude des supports génétiques (plasmidiques ou chromosomiques) responsables d'une éventuelle dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif.
- Suivit, dans le temps, de l'évolution des mécanismes de résistance.

Afin de limiter, au moins, l'émergence de souches multi- résistantes, on insiste plus sur la mise en place d'un système de contrôle de l'environnement de l'hôpital, l'application stricte des mesures d'hygiène et l'usage rigoureusement contrôlé de l'antibiothérapie associé.

Il est certain que seuls des efforts soutenus en termes d'hygiène et de suivi épidémiologique seront à même de pouvoir contrôler ce genre de dissémination extrêmement préoccupante en Santé Publique.



Références bibliographiques

Ait el Kadi M, Aghrouch M, Seffar M, El harti J, Bouklouze A, Cherrah Y, Souly K, Zouhdi M. (2006). Prévalence des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production des métallo β -lactamases. Med Maladies Infect. 36, 386-389.

Al- Sweih NA, Al- Hubail M et Rotimi VO. (2012). Three clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with high diversity of carbapénémases isolated from patients in two hospitals in Kuwait. J Infect Public Health.5, 102-108.

Amazian K, Fendri C, Missoum MF, Bouzouaia N, Rahal K, Savey A, et al.2006. Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. Eur J Clin Microbiol Infect Dis;25:340-3.

Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2007;45: 2793-5.

Avril JL, Dabernat H, Denis F et Monteil H. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses, 2000 ; 602p.

Bakour S, Kempf M, Touati A, Ameer AA, Haouchine D, Sahli F et Rolain JM. (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* two university hospitals in Algeria. J Med Microbiol. 61, 1341-1343.

Ben Haj AK et Khedher M. (2010). Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*A. baumannii* isolées dans la région de Mahdia. Med Maladies Infect.40, 126-128.

Benradouane M., Belloui A, Amhis W.2012. Evolution, répartition et résistance aux antibiotiques des souches isolées. Laboratoire central de biologie, Hopital Bouloghine Ibn Ziri, Alger, Algérie ; P.240.

Berche P et Gaillard JL. *Acinetobacter* et autres bacilles à Gram négatif. In : BERCHE P, GAILLARD JL et SIMONET M, eds. Bactériologie : les bactéries des infections humaines . Paris : Flammarion , 1988 ; 2219.

Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens : microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996 ; **9** : 148-65.

Bou G, Martinez J. 2000. Cloning nucleotide sequencing and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii* .Antimicrob Agents chemother; 44: 428-32

Bouvet, P. J., and M. L. Joly-Guillou. 2000. *Acinetobacter*, p. 1239-1256. In ESKA (ed.), Précis de bactériologie clinique.

Bouzenoune F, KellabDebbih K, Boudersa F, Khouhil S, et Nezzar N. (2010). Sensibilité aux antibiotiques des *Salmonella enterica* sérotype Typhi isolées des hémocultures à l'hôpital d'Ain M'lila (Algérie), entre 2005 et 2008. Med Ma Infect.4, 181-185.

Brown S, young HK, amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infect 2005 ; **11** : 15-23.

Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother **39**:1211-33.

Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E., 2004. Bêta-lactamines. EMC-Maladies infectieuses. 1 : 129-202.

Corvec S, caroff N, espaze E, et al. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J Antimicrob Chemother 2003 ; **52** : 629-35.

Clinical laboratory standards Institute : Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale.(6^{ème} édition 2011).

Devaud M, kayser FH, bachi B. Transposon- mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1982 ; **22** : 323-9.

Donald HM, scaife W, amyes SG, et al. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ; **44** : 196-9.

Drissi M, Poirel L, Mugnier PD, Baba Ahmed Z et Nordmann P.(2010). The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp : An Overview. *Microb.2*, 111.

Drongeun Yong, Kyungwon Lee, Jong Hwa Yum, HeeBon Shin, Gian Maria Rossolini, and Yunsop Chong. Octob 2002. Imipenem- EDTA Disk method for differentiation of metallo- β lactamase- producing clinical isolates *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, P.3798- 3801.

Ehlers M.M, J.M. Hughes and M.M, 2012. Prevalence of Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* ; 18: 250-9.

Fais T, R.N. Tan, Bonnet.R, Robin.F.2011. Evaluation de trois techniques de détection de carbapénèmases chez les entérobactéries. Laboratoire de Bactériologie, CHU JE 2526, USC INRA 2018, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France ; 142p.

Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N.2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* ; 17: 552-6.

Goldstein FW, Labigne-roussel A, Gerbaud G, et al. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid* 1983 ; **10** : 138-47.

Guillaume P .Y., 2004. La microbiologie. Les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques. p 12.

Huang T.D, Tilieux J, Berhin C, Bogaearts P, Glupczynski Y.2011. Comparative evaluation several combination disk tests for the phenotypical detection of carbapenemase producing Gram negative. Centre de reference National des Bacilles Gram negative multirésistants, CHU Mont Goddine Y voir , Belgique ;142p.

Héritier C, Poirel L, Fournier PE, et al. Characterization of the naturally-occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005 ; **49** : 4174-9.

Kassah-Laouar.A, Bessanane.K.N.S.2012. Diffusion épidémique des souches cliniques d'Acinetobacter spp.résistantes aux carbapénèmes au CHU Batna, Algérie; 150p.

Lee, K., Y. Chong, H.B. Shin, Y.A. Kim, D. Young, and J.H. Yum. 2000. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin. Microbiol. Infect. 7, 88-102.

Lepape A., 2007. Impact de la résistance bactérienne sur les prescriptions d'antibiotiques. Congrès national d'anesthésie et de réanimation 2007. Conférences d'actualisation. P : 227-237.

Liaizid A.2012. Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes. Mémoire de Thèse de magister, Université de Tlemcen.

Marques M, Poirel L, Héritier C.2005. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. J Clin Microbiol ; **43** : 4885-8.FEMS.37, 130-155.

McConnell MJ, Actis L et Pachon J. (2013). *Acinetobacter baumannii* : humain infections factors contributing to pathogenesis and animal models.

Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhouche S.N, Rolin J.M. 2013. Prevalence of carbapenemase – encoding genes including New Delhi metallo- β - lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect DIS* ; 5:1683.

Morbido F. 2005. Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotiques des *Acinetobacter* et des staphylococcus a coagulase négative a l'hôpital du point G. Thèse de doctorat, Université Bamako.

Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des* 1999 ; 5 : 865-79.

(National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7–A6. Wayne, PA: NCCLS, 2003.

Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, et al. Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase *bla*PER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 ; 49 : 1708-13.

Poirel L, Marque S, Heritier C. 2005. OXA-58 a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 49:202-8.

Poirel L et Nordmann P. (2006). Résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. Edition Masson, Paris. P100-107.

Richet HM, Mohammed J, McDonald LC, et al. Building communication networks: international network for the study and prevention of emerging antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* 2001 ; 7 : 319-22.

Sato K, Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1991 ; 28 : 35-45.

Segal H, Nelson EC, Elisha BG. Genetic environment of ampC in *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 ; **48** : 612-4.

Soussy C.-J. 2007. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie. P: 21-46.

Tipper, D. J. 1985. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* **27**:1- 35.

Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M et Djahoudi A. (2012). Emergence of bla OXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Ag.* 40, 84-93.

Van looveren M, Goossens H, Arpac Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004 ; **10** : 684-704.

Vahaborgln H, Ozturk R, Aygun G, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey : a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 ; **41** : 2265-9.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm. *Clin Microbiol Rev* 2005 ; **18** : 306-25.

Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossilini GM et Chong Y.(2002). Imipenem-EDTA Disk Method for differentiation of Metallo β -lactamase-producing Clinical isolates of *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 40, 3798-3801.

Yu-Chi Lin, Ko-Chiang Hsia, Yee-Chun Chen, Wang-Huei Sheng, Shan-Chwen Chang, Mei-Hui Liao, and Shu-Ying Li.(May 2010). Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Clinical Isolates in Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy* May 2010, p. 2078–2084.

Zarilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, et Tsakris A.(2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: The epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Cties.* 3, 335-341.

Zarilli R, Pournaras S, Giannouli M et Tsakris A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Ag.*41, 11-19.



Annexes

ANNEXES N° I

Diamètre des zones d'inhibition et des CMI pour *Acinetobacter* spp édités par le CLSI, 2011

Antibiotiques	Charges des disques	Diamètres d'inhibitions (mm)			CMI critiques (ug /ml)			Comentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ticarcilline	75	≤14	15-19	≥20	128	32-64	16	Le disque de TCC doit être placé à coté du disque de CAZ. Une synergie entre les deux disques indique la présence d'une BLSE (voir recherches complémentaires).
Ticarcilline + ac.clavulanique	85	≤14	15-19	≥20	128/2	32/2-64/2	16/2	
Pipéracilline	100	≤17	18-20	≥21	128	32-64	16	
Céftazidime	30	≤14	15-17	≥18	32	16	8	
Imipinème	10	≤13	14-15	≥16	16	8	4	
Gentamicine	10	≤12	13-14	≥15	16	8	4	
Tobramycine	10	≤12	13-14	≥15	16	8	4	
Ciprofloxacine	5	≤15	16-20	≥21	4	2	1	
Triméthoprime+sulfaméthoxazole	25	≤10	11-15	≥16	4/76	-----	2/38	
Rifampicine	30	<14	14-18	≥19	>16	16-8	≤4	Lecture valable pour <i>S. maltophilia</i> -Diluer l'inoculum 0,5 MF au 1/10 ^{ème}
Doxycycline	30	≤9	10-12	≥13	16	8	4	Si résistance à doxycycline, réponse valable pour tétracycline

Remarque :

L'acide nalidixique et l'aztréonam n'ont pas été mentionnés dans ce communiqué CLSI(2011), ni dans d'autres version(CA SFM, 2010).

ANNEXE N° II

Résultats des profils de résistance des souches d'*A baumannii*

Code	TIC	PIP	CAZ	SXT	IMP	TCC	AN	GN	TOB	DO	CIP	ATM	RA	CS
570	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	13	S	S
562	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R	16	S	S
519	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	S	S
652	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	13	S	S
598	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	S	S
624	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
503	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S
533	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
502	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	16	S	S
4545	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	16	S	S
690	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	13	S	S
640	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S
532	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
699	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S
697	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	12	S	S
707	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	15	S	S
679	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	15	S	S
483	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	12	S	S
5454	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
5560	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	16	S	S
787	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	15	S	S
5556	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	17	S	S
5860	R	R	R	S	S	S	15	I	S	S	S	11	S	S
5926	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	12	S	S
950	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11	S	S

ANNEXE N°III

Composition des milieux de culture (En g/l)

(Le Minor et Richard, 1993)

Gélose Hektoen	
Protéose peptone	12 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de soduim	5 g
Thiosulfate de sodium	5 g
Sels biliaries	9 g
Citrate de fer amoniacal	1,5 g
Salicine	2 g
Lactose	12 g
Saccharose	12 g
Fushine acide	0,04 g
Bleu de bromothymol	0,065 g
Agar	14 g
Gélose Moeller Hinton	
Infusion de viande de bœuf	300 g
Hydrolysats de caséine	17,5 g

Amidon	1,5 g
Agar	17 g
Gélose TSI	
Extrait de viande de bœuf	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone tryptique	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate ferrique	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Glucose	1 g
Rouge de phénol	0,05 g
Agar	12 g
Bouillon nutritif	
Bio- Glytone	5 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	8 g
Gélose	15 g

ANNEXE N°IV

➤ Préparation du tampon phosphate à 0,01 M, Ph 7,2 (pKa= 7,2)

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left[\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right] \longrightarrow \log \left[\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right] = 0 \longrightarrow \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = 10 \text{ et } [\text{A}^-] + [\text{HA}] = 0,01$$

$$\longrightarrow 10 [\text{HA}] = [\text{A}^-] \longrightarrow 11 [\text{HA}] = 0,01 \longrightarrow [\text{HA}] = 9,1 * 10^{-4} \text{ M} ; [\text{A}^-] = 9,09 * 10^{-3}$$

Dont $[\text{A}^-] = [\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ (MM= 358.13g/ mol) et $[\text{HA}] = [\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ (MM= 156.01 g/mol).

$$C = n / V \longrightarrow CV = n \text{ et } n = m / M \longrightarrow CV = m / M \longrightarrow m = CVM$$

$$\longrightarrow m \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + 9,09 * 10^{-3} * 100 \text{ ml} * 10^{-3} * 358,13.$$

$$\longrightarrow m \text{ Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 0,324 \text{ g}$$

$$\longrightarrow m \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,014 \text{ g}$$

La solution de tampon phosphate à 0.01 M (mol/l), pH 7.2 est préparée par dissolution de 0.324 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ et de 0.014 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau distillée , puis ajustée au Ph 7,2 stérilisée par autoclavage pendant 20 mn à 120°C°.

ANNEXE N° V

1- Matériel :

1-1 Souches étudiées : Durant notre stage, nous avons isolées 25 souches d'*A. baumannii* de divers prélèvements (**urines, crachats, prélèvements distaux protégé, peau brulée.....**)

1-2 Milieux de cultures et réactifs :

Les différents milieux de culture et réactifs utilisés durant notre étude sont :

- La gélose nutritive (Bio Rad)
- La gélose Hektoen (Bio Mérieux)
- La gélose au sang cuit
- Milieux Moeller Hinton (Bio Mérieux)
- Disques d'oxydase (Bio Mérieux)
- Huile de vaseline stérile
- Réactif de Kovac
- Colorant : Violet de Gentiane, fuschine, lugol, alcool
- Galerie API 20 E (Bio Mérieux)
- Oxydase
- **Antibiotiques testés:** en diques et en poudre

Tableau I : Listes des antibiotiques utilisés

Antibiotiques	Charge (ug/ml)	Nom de fabricant
Les β- lactamines		
Ticarcilline	75	Liofilchem
Pipéracilline	100	Bio Rad
Céftazidime	30	Liofilchem
Ticarcilline +Ac clavulanique	85	Liofilchem
Aztréonam	30	Liofilchem
Imipénème	10	Liofilchem
Céfotaxime	30	Liofilchem
Céfepime	30	Bio Rad
Les aminosides		
Gentamycine	10	Bio Rad
Tobramycine	10	Liofilchem
Les quinolones		
Acide nalidixique	30	Liofilchem
Ciprofloxacine	5	Bio Rad
Les cyclines		
Doxycycline	30	Liofilchem
Sulfamides et associés		
Triméthoprim +Solfaméthxazole	25	Liofilchem
Autres		
Rifampicine	30	Bio Rad
Colistine	-----	Bio Rad

Résumé

Alors que l'isolement de souches de *Acinetobacter baumannii* résistantes aux β lactamines à spectre large est en constante augmentation. L'objectif de ce mémoire est de déterminer le phénotypes de résistance aux β -lactamines parmi les souches cliniques d'*Acinetobacter baumannii* isolées à l'HCA. Durant ce mémoire 25 souche d'*A. baumannii* ont été isolées après plusieurs étapes d'identification (examen microscopique, galerie biochimique API NE, incubation 44C°) toutes les souches ont été soumises à un antibiogramme. selon le profil de l'antibiogramme obtenus des tests complémentaire ont été effectuée, test de Hodge modifiée pour la détection des carbapénèmases, test d'EDTA et imipenème pour la détection des métallobarbapénèmases, test à la cloxacilline pour la détection de cephalosporinase produites ou hyperproduites, test oxacillinase pour la détection des oxacillinases. Sur les 25 souche d'*A. baumannii* isolées 72% sont IMP (R), 88% CAZ(R) et résistant à la plus parts des autres antibiotiques utilisés mais en gardent une sensibilité de 100% vis à vis colistine et rifampicine. quand au tests complémentaires, 14 souches sont positives au test EDTA- imipenème, 13 ont un test Hodge modifié positives, 18 souches cloxacilline positives, 7 souches ont oxacillinases positives. il est certain que seuls des efforts soutenus en termes d'hygiène et de suivi épidémiologique seront à même de pouvoir contrôler ce genre de dissémination extrêmement préoccupante en Santé Publique.

Mots clés : β - lactamines, *A. baumannii*, Résistance à l'imipenème, Métallo-carbapénèmases, Hôpital de Ain Naadja

Abstract

While the isolation of strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to broad-spectrum β lactam antibiotics is increasing. Objective of this paper is to determine the phenotype of resistance to β -lactam antibiotics among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated HCA. During this brief 25 strain of *A. baumannii* were isolated after several identification steps (microscopic examination, biochemical gallery API NE, incubation 44C °) all the strains were subjected to a sensitivity. according to the profile of the susceptibility obtained from additional tests were performed, modified Hodge test for the detection of carbapenemase, imipenem and EDTA test for the detection of metallo-carbapenemases, cloxacillin test for the detection of cephalosporinase produced or hyperproduites, oxacillinase test for the detection of oxacillinases. on 25 strain of *A. baumannii* isolated 72% IMP (R), 88% CAZ (R) and resistant to most other antibiotics used parts but keep a sensitivity of 100% overlooked colistin and rifampicin, when the additional tests, 14 strains are positive the imipenem-EDTA test, 13 a modified Hodge test positive, 18 strains cloxacillin positive 7 souches have oxacillinases positive. it is certain that only a sustained effort in terms of hygiene and epidemiological monitoring will be able to control this kind of dissemination of serious concern in Public Health.

Keywords: β -lactams, *A. baumannii*, resistance to imipenem, metallo-carbapenemases, Hospital Ain Naadja.

