

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction.....1

Partie I: Etude bibliographique

1. Les bacilles à Gram Négatif	5
1. 1. Entérobactéries.....	5
1.1.1. Historique et Taxonomie.....	5
1.1.2. Habitat.....	6
1.1.3. Caractères bactériologiques.....	6
1.1.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	8
1.1.4.1. Mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines.....	8
1.1.4.1.1. Résistance non enzymatique.....	8
1.1.4.1.2. Résistance enzymatique.....	9
1.1.4.2. Mécanismes de résistance aux Aminosides ou Aminoglycosides.....	16
1.1.4.3. Mécanismes de résistance aux Quinolones.....	18
1.1.5. Epidémiologie.....	18
1.1.5.1. A l'échelle mondiale.....	18
1.1.5.2. A l'échelle Nationale.....	24
1.2. Bacilles à Gram Négatif non fermentants.....	26
1.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	26
1.2.1.1. Historique et Taxonomie.....	26
1.2.1.2. Habitat.....	27
1.2.1.3. Caractères bactériologiques.....	27
1.2.1.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	28

1.2.1.4.1. Mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines.....	29
1.2.1.4.1.1. Résistance naturelle.....	29
1.2.1.4.1.2. Résistance acquise	29
1.2.1.4.1.2.1. Résistance non enzymatique.....	29
1.2.1.4.1.2.2. Résistance enzymatique.....	30
1.2.1.4.2. Mécanismes de résistance aux Aminosides.....	32
1.2.1.4.3. Mécanismes de résistance aux Quinolones.....	33
1.2.1.5. Epidémiologie	34
1.2.1.5.1. A l'échelle mondiale.....	34
1.2.1.5.2. A l'échelle nationale.....	37
1.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	38
1.2.2.1. Historique et taxonomie.....	38
1.2.2.2. Habitat.....	39
1.2.2.3. Caractères bactériologiques.....	39
1.2.2.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	40
1.2.2.4.1. Mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines.....	40
1.2.2.4.1.1. Résistance naturelle.....	40
1.2.2.4.1.2. Résistance acquise.....	41
1.2.2.4.1.2.1. Résistance non enzymatiques.....	41
1.2.2.4.1.2.2. Résistance enzymatique.....	41
1.2.2.4.2. Mécanismes de résistance aux Aminosides.....	44
1.2.2.4.3. Mécanismes de résistance aux Quinolones.....	44
1.2.2.5. Epidémiologie.....	45
1.2.2.5. 1. A l'échelle mondiale.....	45
1.2.2.5.2. A l'échelle nationale.....	48
Partie II: Matériel et méthodes	
1. Isolement des souches bactériennes.....	50

2. Identification des souches.....	50
2.1. Système API 20E et API 20NE : (bio Mérieux, France).....	51
2.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	51
3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	53
4. Détermination des concentration minimales inhibitrices (CMI) par E. test.....	55
5. Détection phénotypique des β-lactamases.....	56
5.1. Recherche de la production du BLSE.....	56
5.1.1. Test de synergie.....	56
5.1.2. Test de confirmation (technique du double disque).....	57
5.2. Recherche de la production des Carbapénèmases.....	58
5.2.1. Test de Hodge modifié.....	58
5.2.2. Test à l'EDTA : (pour les métallo-β-lactamases (MβL)	58
5.2.2.1. Méthode EDTA-disque synergie.....	59
5.2.2.2. Méthode des disques combinés.....	59
5.2.3. Test Carba NP modifié.....	59
6. Détection moléculaires des β-lactamases.....	61
6.1. Extraction de l'ADN.....	61
6.2. Polymérase Chain Réaction (PCR) en temps réel.....	61
6.3. Polymérase Chain Réaction(PCR) standard.....	63
6.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	65
6.5. Séquençage.....	67
6.6. Analyse des séquences d'ADN.....	68
6.7. Typage des souches.....	69
6.7.1. Biotypage par MALDI-TOF.....	69
6.7.2. Génotypage par MLST : (<i>Multi-locus sequence typing</i>).....	69

Partie III: Résultats et Discussion**Résultats :**

1. Identification des souches bactériennes.....	74
1.1. Répartition des souches selon l'espèce.....	74
1.2. Répartition des souches selon la nature de prélèvement.....	86
1.3. Répartition des souches selon le service.....	86
1.4. Répartition des souches selon le sexe.....	87
1.5. Répartition des souches selon l'âge.....	88
2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	88
2.1. Antibiogramme par diffusion de disque sur un milieu gélosé.....	88
2.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test.....	96
3. Recherche phénotypique de la résistance aux antibiotiques.....	97
3.1. Recherche phénotypique des β-lactamases.....	97
3.1.1. Recherche phénotypique des BLSE.....	97
3.2. Recherche Phénotypique des carbapénèmases.....	98
4. Recherche moléculaire des gènes de résistance.....	104
4.1. Recherche moléculaire des β-lactamases à spectre étendu.....	104
4.2. Recherche moléculaire des carbapénèmases.....	110
4.3. Recherche moléculaire de l'OpD.....	113
5. Séquençage et analyse des séquences.....	114
6. Arbre phylogénétiques.....	117
7. Typage des souches	119
7.1. Biotypage par MALDI-TOF	119
7.2. Génotypage par MLST	125
Discussion.....	129

Partie IV: Conclusion et perspectives.....151

Références bibliographiques.....154

Résumés

Annexes

Liste des abréviations

AAC : aminoglycosides N-acétyltransférases

Aad : aminoglycosides O-adényltransférases

ACC : Ambler class C

ACT : AmpC type

ADN : acide désoxyribonucléique

AmpC : β -lactamases chromosomique

ANT : aminoglycosides O-nucléotidyltransférases.

API : Analytical profile index.

APH : aminoglycosides O-phosphotransférases

Arm : Aminoglycoside resistance methylase

ARNT : Acide ribonucléique de transfert

BCP : pourpre debromocrésol

BEL : Belgium extended-spectrum β -lactamase

BES : Brazilian extended-spectrum β -lactamase

BET : Bromure d'Ethidium

BGN : Bacilles à Gram négatif

BIL : Bilal

Bla : beta-lactamase

BLSE : β -lactamases à spectre étendu .

BMR : Bactéries multirésistantes

BPO : bactéries pathogènes opportunistes.

BPS : bactéries pathogènes spécifiques

CARB : Carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase

CarO : Carbapenem-associated outer membrane protein

CA-SFM : comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

C1G : céphalosporines de 1^{ère} génération

C2G : céphalosporines de 2^{ème} génération

C3G : céphalosporines de 3^{ème} génération

C4G : céphalosporines de 4^{ème} génération

CHU: Centre hospitalier universitaire

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CMY : cephamycins

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

CTX-M : Céfotaximase -Munich

DHA : Dharhan hospital.

EDTA : ethylene diamine tetracetic acid

GES : Guyana Extended-Spec trum Beta-lactamase

GIM : German imipenemase.

HPLC : La chromatographie en phase liquide à haute performance .

HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique

I β L : les inhibiteurs de β -lactamases

IBC-2 : integron-borne cephalosporinase

IMI : Imipénémase de *Aeromonas Sobria*

IMP : Imipénémase

KHM : Kyorin Hospital Metallo-enzyme.

KLUA : *Kluyvera ascorbata*

KPC : *Klebsiella Pneumoniae* Carbapénémase

LAT : Latamoxef

LPS : lipopolysaccharide

MALDI-TOF-MS : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight-Mass Spectrometry

MBL : métallobéta- lactamases.

Min : Minute

MIR : Miriam Hospital

MFS : Major Facilitator Superfamily

NDM : New Delhi metallo-bêta-lactamase

ONERBA : Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques

OXA : oxacillinases

OXY : *oxytoca*

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PER : *Pseudomonas* extended resistance

PLPs : protéine liant a la pénicilline.

PMQR : Les plasmides médiateurs de la résistance aux quinolones.

Qnr : Quinolone Resistance gene

Rmt : ARNr 16S méthyltransférase

RND : Resistance Nodulation Division

SFC : *Serratia fonticola* resistant to carbapénème

SFO : *Serratia fonticola*

SHV : Sulphydryl variable

SMART: Study for monitoring antimicrobial resistance trends

SME: *Serratia marcescens* enzyme β -lactamase

SPM : Sao Paulo Metallo-enzyme

TBE: Tris-Borate-EDTA

TEM : Temoneira - nom du patient

TLA : Tlahuicas - tribu indienne

USA : Etats-Unis d'Amerique

UV: Ultar violet

VEB : Vietnamese Extended spectrum β -lactamase

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIM :Verona Integron encoded Metallo-bêta-lactamase

Liste des Tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Les différents genres des Entérobactéries	6
2	Principaux caractères biochimiques des Entérobactéries	7
3	Phénotypes de résistance naturelle des Entérobactéries	10
4	Métallo-bêta-lactamases décrites chez les entérobactéries dans le monde	14
5	Déterminants de résistance aux aminosides, aux quinolones en Algérie	17
6	Principaux caractères biochimiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
7	Interprétation des scores obtenue par MALDI-TOF	53
8	Liste des antibiotiques testés	54
9	Interprétation des résultats du Carba NP test modifié	60
10	Amorces et sondes utilisées pour les PCR en temps réel	62
11	Composition des mélanges réactionnels pour les PCR en temps réel	63
12	Amorces utilisées pour les PCR standard	64
13	Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard	65
14	Composition des mélanges réactionnels pour les PCR BigDye	67
15	Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage pour <i>Acinetobacter baumannii</i>	71
16	Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
17	Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage pour <i>Klebsiella pneumoniae</i>	73
18	Caractérisation des souches de <i>Klebsiella spp.</i> et leur score MALDI-TOF	76
19	Caractérisation des souches <i>Escherichia coli</i> et leur score MALDI-TOF	79
20	Caractérisation des souches <i>Enterobacter spp.</i> et leur score MALDI-TOF	81
21	Caractérisation des souches <i>Proteus spp.</i> et leur score MALDI-TOF	82
22	Caractérisation des souches <i>Serratia spp.</i> et leur score MALDI-TOF	83
23	Caractérisation des souches <i>Morganella morganii</i> et leur score MALDI-TOF	83
24	Caractérisation des souches <i>Providencia spp.</i> et leur score MALDI-TOF	84
25	Caractérisation des souches <i>Citrobacter spp.</i> et leur score MALDI-TOF	84
26	Caractérisation des souches <i>Acinetobacter baumannii</i> et leur score MALDI-TOF	84

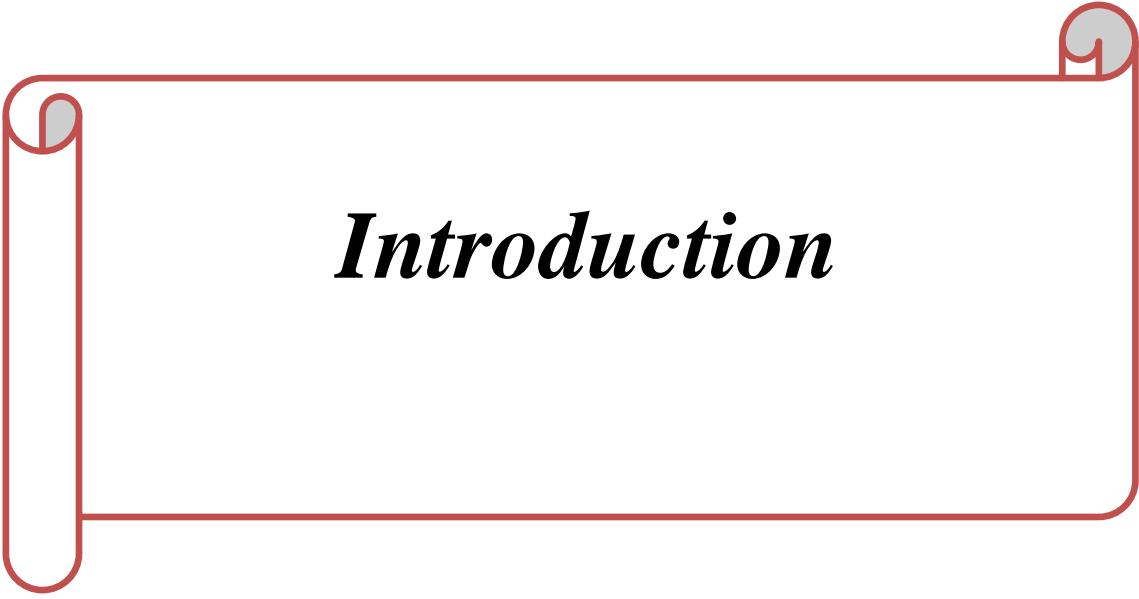
27	Caractérisation des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et leur score MALDI-TOF	85
28	Profil de résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram Négatif isolées	93
29	Génotypage des <i>K. pneumoniae</i> résistantes à l'Ertapénème par MLST	127
30	Génotypage des <i>A. baumannii</i> résistantes à l'imipénème par MLST	127
31	Génotypage des <i>P. aeruginosa</i> résistantes à l'imipénème par MLST	127
32	Présentation des β -lactamases décrites en Algérie jusqu'à 2016	138
33	Carbapénèmases détectées dans les isolats cliniques dans différentes Villes de l'Algérie	145

Liste des Figures

Numéro	Titre	Page
1	Chaine d'identification par Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight « MALDI-TOF » à partir de colonie, d'échantillon d'hémocultures ou d'urines positives	52
2	Détermination de la CMI par E.test	56
3	Test positif : mise en évidence d'une BLSE	57
4	Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénèmases	58
5	Principe du test Carba NP modifié	59
6	Pas de production de carbapénèmase	60
7	production de carbapénèmase	60
8	résultat non interprétable	60
9	Programme de l'amplification de la PCR en temps réel	63
10	Programme de la PCR standard	65
11	Analyse du produit PCR sur gel d'agarose	66
12	Programme de la PCR BigDye	68
13	Scores d'identification bactérienne obtenue par le MALDI-TOF	74
14	Répartition des bacilles à Gram négatif selon les espèces	75
15	Répartition des espèces selon la ville	75
16	Répartition des souches par nature de prélèvements	85
17	Répartition des espèces par services	86
18	Répartition des espèces selon le sexe	86
19	Répartition des espèces selon l'âge	87
20	Pourcentage de la résistance des entérobactéries a la famille des <i>B</i> -lactamines	91
21	Pourcentage de la résistance des entérobactéries a la famille des aminosides	92
22	Pourcentage de la résistance des BGN non fermentants aux antibiotiques	92
23	Antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> N° 24 résistante à L'Ertapénème et possédant le gène <i>bla</i> _{OXA-48}	91

24	Antibiogramme des <i>Enterobacter cloacae</i> N°12 résistante à L'Ertapénème	91
25	Antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i> ALG-2 résistante à l'Imipénème et possèdent le gène <i>bla</i> _{VIM-4}	92
26	Antibiogramme de <i>A. baumannii</i> N°2 résistante à l'Imipénème et possèdent le gène <i>bla</i> _{NDM-1}	92
27	CMI par Etest Ertapénème	93
28	CMI par Etest Imipénème	93
29	Test de synergie pour <i>K. pneumoniae</i> N° 24	94
30	Test de double disque pour <i>A. baumannii</i> N°1	95
31	Résultat positif pour le test Carba NP pour <i>Klebsiella pneumoniae</i>	96
32	Résultat positif pour le test Carba NP pour les BGN	96
33	Résultat non interprétable pour <i>Serratia marcescens</i> N°4	97
34	Test de Hodge positif pour <i>K. pneumoniae</i> N°24 et N°58	98
35	Test de Hodge positif pour <i>E. cloacae</i> N°12 et N°6	98
36	Test de Hodge positif pour <i>P. aeruginosa</i> ALG-19 et <i>A. baumannii</i> N°2	99
37	Test de l'EDTA pour <i>P. aeruginosa</i> ALG-12	100
38	Test de l'EDTA pour <i>P. aeruginosa</i> ALG-19	100
39	Test de l'EDTA pour <i>A. baumannii</i> N°2 et <i>A. baumannii</i> N°7	101
40	PCR en temps réel du gène <i>bla</i> _{CTX-M} des 20 entérobactéries	102
41	PCR en temps réel du gène <i>bla</i> _{TEM} des 20 entérobactéries	102
42	PCR en temps réel du gène <i>bla</i> _{SHV} des 20 entérobactéries	103
43	PCR en temps réel du gène <i>bla</i> _{TEM} des <i>A. baumannii</i>	103
44	Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M} pour les entérobactéries	105
45	Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla</i> _{TEM} pour les entérobactéries	105
46	Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla</i> _{SHV} pour les entérobactéries	106
47	Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla</i> _{TEM} pour <i>A. baumannii</i>	106

48	Résultats des PCR du gène <i>bla</i> _{OXA-48} pour les entérobactéries	108
49	Résultats des PCR du gène <i>bla</i> _{VIM} pour <i>P. aeruginosa</i>	108
50	Résultats des PCR du gène <i>bla</i> _{NDM-1} pour <i>A. baumannii</i>	109
51	Résultats des PCR du gène <i>bla</i> _{OXA-23} pour <i>A. baumannii</i>	109
52	Résultat de PCR standard du porine OprD pour <i>P. aeruginosa</i>	110
53	Résultat de l'ARG-ANNOT pour <i>P. aeruginosa</i> ALG-2	111
54	Nucleotide alignment entre la souche de référence VIM-4 et <i>P. aeruginosa</i> ALG-2 et ALG- 19 obtenues	112
55	Alignements avec Clustal W de <i>P. aeruginosa</i> N°1 et <i>P. aeruginosa</i> ALG-2 avec la souche de référence PAO1	113
56	Alignements avec Clustal W de <i>P. aeruginosa</i> N°3 et <i>P. aeruginosa</i> N°4 avec la souche de référence PAO1	113
57	Arbre phylogénétique du gène <i>bla</i> _{CTXM} avec les souches de référence	114
58	Arbre phylogénétique du <i>P. aeruginosa</i> ALG- 2 et ALG- 19 avec les souches de référence de VIM	115
59	Biotypage des bacilles à Gram Négatif isolées aux trois villes de l'est Algérie par MSP dendrogramme	117
60	Biotypage des <i>Klebsiella</i> spp. par MSP dendrogramme	118
61	Biotypage des <i>Enterobacter</i> spp. par MSP dendrogramme	119
62	Biotypage des <i>Serratia</i> spp. par MSP dendrogramme	119
63	Biotypage des <i>Proteus</i> spp. par MSP dendrogramme	120
64	Biotypage des <i>E. coli</i> par MSP dendrogramme	120
65	Biotypage des <i>P. aeruginosa</i> par MSP dendrogramme	121
66	Biotypage des <i>Acinetobacter baumannii</i> par MSP dendrogramme	121
67	Résultats de PCR standard de MLST pour <i>P. aeruginosa</i>	123
68	Génotypage des <i>P. aeruginosa</i> par MLST	125
69	Carbapénèmases décrites dans des souches cliniques des bacilles à Gram négatif de l'Algérie	141
70	Propagation mondiale de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productrice de VIM-4	144
71	Typage des souches des <i>P. aeruginosa</i>	147



Introduction

A la fin du XIXe siècle, les travaux de **Louis Pasteur** et **Robert Koch** ont changé l'approche du traitement des maladies infectieuses, en peu de temps, le développement et l'utilisation d'agents antibactériens comme les sulfamides (dans les années 1930) et la pénicilline (vers la fin des années 1940) ont remplacé l'utilisation thérapeutique de composés beaucoup plus toxiques comme le mercure. Par la suite, de nombreux antibiotiques ont été découverts ou synthétisés permettant de traiter les maladies infectieuses (**Merad Boudia, E., 2014**).

En plus des bénéfices évidents pour la santé humaine, l'introduction et l'usage des antibactériens en médecine vétérinaire ont sans nul doute, contribué à l'amélioration de la productivité et de la santé animale au cours des dernières décennies (**Piddock, L.J., 1996** ; **Johnston, A.M., 1998**). Cependant, leur utilisation dans l'alimentation animale en tant que promoteur de croissance ou pour la prévention et le traitement de différentes maladies infectieuses a également contribué à une sélection de résistance vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques (**Harbottle, H., et al., 2006**).

Cependant, la résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution. Cette résistance bactérienne est le résultat d'interactions complexes entre la bactérie d'une part et son environnement d'autre part, elle est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire ou dans l'alimentation animale. Les bactéries pour faire face à la pression de sélection exercée par les antibiotiques utilisent des parades leur permettant de s'adapter aux conditions hostiles de leur environnement (**Ben redjeb, S., et al., 2000**).

Le groupe des bacilles à Gram négatif compte actuellement plusieurs espèces bactériennes, parmi lesquelles on trouve telles qui font parties des entérobactéries qui sont responsables de nombreuses infections nosocomiales et infections communautaires notamment les infections urinaires, les gastro-entérites sévères, les infections respiratoires. Ces bactéries présentent fréquemment une résistance acquise aux antibiotiques à large spectre, cette résistance est souvent conditionnée par la présence de plasmides porteurs de déterminants de résistance multiples et transférables à d'autres bactéries à Gram négatif.

Cependant, de nombreuses autres espèces appartiennent aux bacilles à Gram négatif, tels que : *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* sont à l'origine des infections nosocomiales diverses notamment chez les immunodéprimés (**Bert, F., Lambert-Zechovsky, N., 2007**).

L'importance de ces bacilles à Gram négatif est liée à leur multi résistance aux antibiotiques actuellement disponibles notamment les β -lactamines, les aminosides et les quinolones ; c'est pourquoi ont suscité de nombreuses études ces dernières décennies (**Gueye, O., 2007**).

Les β -lactamines demeurent les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante, cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité , à leur pouvoir bactéricide et à la diversité des molécules (**Robin, F., et al., 2012**). En effet, depuis l'introduction de la pénicilline G en thérapeutique dans les années 1940, un grand nombre de molécules incluant les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes a été développé (**Robin, F., et al., 2012**).

La résistance aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif est dominée actuellement par la production de BLSE de type CTX-M et des carbapénémases de type KPC, OXA et métallo-enzymes. Les gènes codant pour ces enzymes sont essentiellement localisés sur des plasmides souvent associés à d'autres gènes de résistance aux autres classes d'antibiotiques. (**Chouchani, C., et al., 2011**)

Les aminosides continuent à jouer un rôle important dans le traitement des infections sévères dues aux pathogènes à Gram négatif souvent en association avec les β -lactamines à très large spectre. Ces antibiotiques agissent en se liant au site aminoacyl (site A) de l'ARN16S de la petite sous-unité ribosomale 30S des procaryotes et interfèrent avec la synthèse des protéines. (**Magnet, S., Blanchard, J.S., 2005**)

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse dont les cibles d'action sont les topo-isomérases II (ADN gyrase) et topo-isomérase IV. Ces molécules sont généralement classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et leur date de mise sur le marché. Leur large utilisation en médecine humaine et vétérinaire a conduit à l'émergence et à l'augmentation de la prévalence de la résistance acquise chez toutes les espèces bactériennes à travers le monde (**Ball, P., 2000**).

La résistance aux aminosides et aux quinolones est marquée par l'émergence et la dissémination des nouveaux déterminants de résistance tel que les méthylases de l'ARN 16S comme ArmA, RmtB et RmtC et les déterminants de résistance plasmidique aux quinolones (plasmid-mediated quinolones resistance [PMQR]) comme les gènes qnr ou encore l'enzyme bi-fonctionnelle AAC[60]-1b-cr.

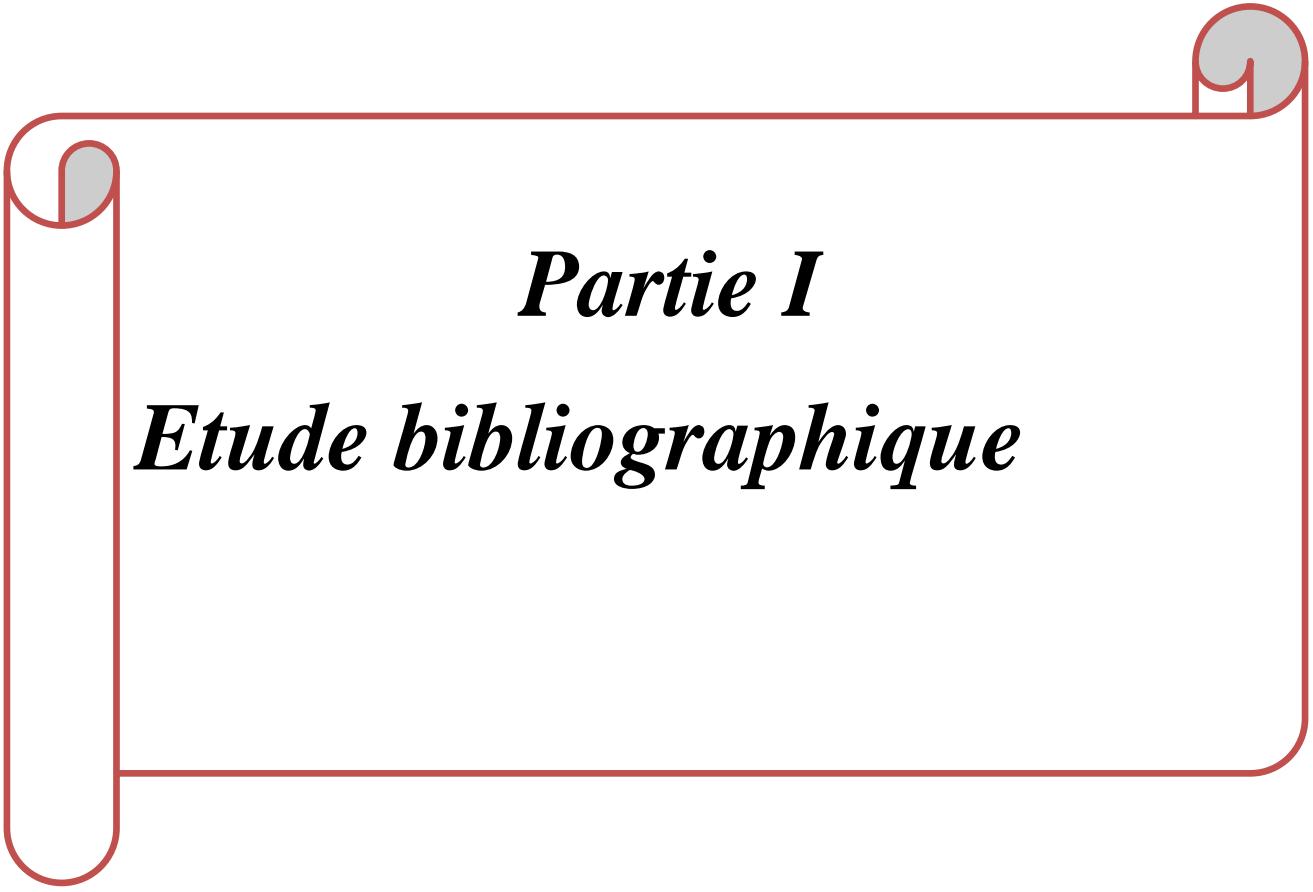
Dans notre étude on s'intéresse aux carbapénèmes qui demeurent les bêta-lactamines au spectre d'activité le plus large. Leur excellente activité antibactérienne est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration transmembranaire à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des bêta-lactamases naturelles ou acquises, y compris les céphalosporinases qu'elles soient chromosomiques ou plasmidiques et les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) (**Nordmann, P., Carrer, A., 2010**) , en plus ce groupe d'antibiotique reste le plus efficace pour le traitement des infections sévères surtout l'imipénème . Cependant l'utilisation souvent excessive des carbapénèmes complique encore la situation car dans la littérature, il est fréquemment décrit l'apparition de nouveaux mutants résistants, et depuis quelques années, l'émergence de carbapénèmases, limitant ou parfois empêchant totalement l'utilisation d'antibiotiques (**Boyer, C., 2013**).

En Algérie, depuis le début de 2010, les carbapénèmases de la classe Ambler D OXA-23 et OXA-58 type ou de classe B type, y compris VIM-19 enzyme, ont été considérés comme les premiers carbapénèmases détectés dans *Acinetobacter baumannii* (**Drissi, M., et al., 2010**; **Mugnier, P.D. , et al., 2010**) et les entérobactéries (**Robin, F., et al., 2010**) respectivement. Par la suite, d'autres types de carbapénèmase classe B (VIM-2, NDM-1 et NDM-5 enzymes), (enzymes CPK) A, et D (OXA-23, OXA-24, et OXA-48 enzymes) ont été signalés, avec certains d'entre eux à devenir endémiques en Algérie (par exemple OXA-23 et NDM-1 à *Acinetobacter baumannii*) (**Mugnier, P.D. , et al., 2010** ; **Bakour, S., et al., 2014**).

La dissémination rapide des bactéries productrices de carbapénèmases ne peut que contribuer à la diffusion des souches multirésistantes, qui peut conduire à de véritables impasses thérapeutiques. Cette diffusion est d'autant plus critique qu'elle survient au moment où le développement de nouvelles molécules actives sur les bacilles à Gram négatif est extrêmement restreint. Le dépistage le plus rapide possible des patients colonisés ou infectés devient dès lors un véritable impératif de santé publique pour les patients eux-mêmes, mais également pour les patients qui partageraient la même structure d'hospitalisation. (**Dortet, L., et al., 2013**)

Par conséquent, les objectifs de notre travail étaient :

- Identification des souches cliniques des bacilles à Gram négatif recueillies entre le mois de Mars 2013 jusqu'au mois de Mars 2015, dans les trois villes (Annaba, Skikda et Guelma) du nord est de l'Algérie.
- Evaluation de la résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques.
- La sélection des souches productrices des BLSE et des carbapénèmases par les méthodes phénotypiques et la confirmation par les méthodes génotypiques (détermination des supports génétiques)
- Typage moléculaire des bacilles à Gram négatif.



Partie I

Etude bibliographique

1. Les bacilles à Gram négatif :

Les bacilles à Gram négatif, fréquemment isolés des laboratoires de bactériologie, occupent une place importante en pathologie humaine. Généralement, ils sont divisés en deux grands groupes :

1. 1. Entérobactéries :

1.1.1. Historique et Taxonomie :

Les entérobactéries constituent un grand groupe des bactéries ayant une forte similitude. La naissance de cette famille se situe entre **1937** lorsque **Otto RAHN** propose le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouvait déjà des noms tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*. (**Niang, O., 2003**)

Don Brenner et Patrick A.D. Grimont leur travaux comme équipe ont permis une véritable explosion de cette famille avec un très grand nombre de nouveaux genres et espèces décrits depuis une vingtaine d'années. (**Ewing, W.H., Edwards, P.R. , 1960 ; Murray, P.R., et al., 1999**).

Edwards et **Ewing** en **1972**, rapportaient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae* (**Edwards, P.R., Ewing, W.H., 1977**). En **1973**, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. En **1985**, **FARMER** et **COLL** décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques. (**Farmer, J.J., 1999**)

Selon **Zavarzin** en **1991** et sur la base du séquençage de l'ADN 16S, les entérobactéries sont placées dans le phylum des *Proteobacteria* qui fait partie des dix groupes formant les bactéries (**Zavarzin, G.A., et al., 1991**). Dans ce groupe, les bactéries appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria* à l'ordre des *Enterobacteriales* et à la famille des *Enterobacteriaceae* dont la subdivision des genres et espèces au sein de la famille des entérobactéries est basée sur la comparaison des caractéristiques **physiologiques, biochimiques, antigéniques et génétiques** des bactéries.

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement près de 140 espèces regroupées en genres identifiés listés dans le tableau (1) (**Leclerc, H., et al., 2001 ; Joly, B., Reynaud, A., 2003 ; Delarras, C., 2003**).

Tableau N° 1 : Les différents genres des Entérobactéries (**Leclerc, H., et al., 2001 ; Joly, B., Reynaud, A., 2003 ; Delarras, C., 2003**).

Genres traditionnels	Genres récemment décrits
<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Shigella, Salmonella, Citrobacter, Hafnia, Proteus, Providencia, Yersinia, Erwinia, Morganella</i>	<i>Cedecea, Ewingella, Pantoea, Rahnella, Budvicia, Buttiauxella, Kluyvera, Leclercia, Tatumella, Moellerella, Trabulsiella, Yokenella, Edwardsiella, Leminorella, Pragia, Photorhabdus, Xenorhabdus, Obesumbacterium, Arsenophorus, Groupes entériques</i>

1.1.2. Habitat :

Les *Enterobacteriaceae* sont nommées ainsi parce que la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve aussi dans la cavité buccale au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux (**Fauchère, J. L., Avril, J. L., 2002**).

Ils peuvent persister en dehors d'organismes vivants dans la nature, on les retrouve également dans le sol et les eaux en raison de la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécales animales et humaines et des eaux d'égout (**Avril, J. M., 2000**), aussi dans les produits alimentaires (produit laitiers, œufs, poissons,....)(**Lehner, A., 2011**). Elles sont : soit des bactéries pathogènes opportunistes (BPO), soit des bactéries pathogènes spécifiques (BPS) (**Avril, J. M., 2000**).

1.1.3. Caractères bactériologiques :

Ce sont des bacilles à Gram négatif de 2-3 µm de long sur 0,6 µm de large, généralement polymorphes, mobiles ou immobiles (*Klebsiella, Shigella, Yersinia pestis*) grâce à une ciliature périrtriche (**Bakhoum, I., 2004**) . La composition caractéristique des bases constituant leur ADN GC% compris généralement entre 50% et 60%, ce qui permet de les différencier des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae* (**Murray, P.R., et al., 1999 ; Bouteleux, C., 2005**) .

La plupart des espèces possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion (**Bossert I. D., Young, L.Y., 1986**), poussent sur les milieux ordinaires (Mac Conkey ou bouillon lactosé au BCP) en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose (**Drame , B., 2001**) .

la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose (**Bakhoum, I., 2004**) . Sur milieux gélosés, les colonies sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S) (**Drame, B., 2001**). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R), les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme (**Pilet, C., 1979**). En milieu liquide, les entérobactéries forme un trouble uniforme du bouillon. (**Bakhoum, I., 2004**)

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis essentiellement "biochimiques", comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases), la formation de gaz....etc. (**Djelouat, S., 2009**).

Pour ce la le tableau (2) résume les principaux caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés :

Tableau N° 2 : Principaux caractères biochimiques des Entérobactéries (**Djelouat, S., 2009**).

Caractéristiques	Glu	Lac	ONPG	Ind	VP	Cit	Mob	URE	PDA	H2S
<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+-
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+-	+	+	-	+	-	-
<i>Serratia</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	-	-	-	-	+-	+	-	-	+
<i>Shigella</i>	+	-	+-	+-	-	-	+	-	-	-
<i>Proteus</i>	+	-	-	+-	-	+-	-	+	+	+-
<i>Providencia</i>	+	-	-	+-	-	+	+	-	+	-
<i>Yersinia</i>	+	-	+	+-	+	-	+	+	-	-

Glu: Glucose, Lac: Lactose, Ind: Indol, VP : Pyruvate de sodium (réaction de Voges-Proskauer), Cit: Citrate, Mob: Mobilité, URE: Urée PDA: Phenylalanine deaminase, H2S: Thiosulfate, ONPG: Ortho-Nitro-Phényl Galactopyranoside.

1.1.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

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

1.1.4.1. Mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines :

1.1.4.1.1. Résistance non enzymatique :

A. Diminution de la perméabilité :

La pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles à travers la membrane externe s'effectue à travers les porines. Ainsi, la sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre des porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (**Kumar, A., Schweizer, H.P., 2005**).

Bien que plus rare, la disparition de porine provoque l'augmentation des Concentration minimale inhibitrice (CMI) de certaines β -lactamines comme : *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *Echerichia coli* (**Yoshimura, F. , Nikaido, H., 1982 ; Nikaido, H., 2000**).

B. Modification de PLP :

La résistance aux β -lactamines conférée par les PLPs (protéine liant à la pénicilline) (**Spratt, B.G., et al., 1989**). Cette résistance peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux β -lactamines (**Georgopapadakou, N.H., 1993**).

Chez les entérobactéries, *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécillinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1. Cependant, ce type de mécanisme reste très rare chez les entérobactéries (**Neuwirth, C., et al., 1995**).

C. Système d'efflux :

Chez *E. coli*, différents systèmes d'efflux contenant des pompes RND ont été décrits dont AcrAB-TolC est le mieux caractérisé (**Kumar, A., Schweizer, H.P., 2005**). Le système AcrAB-TolC est impliqué dans l'excrétion de plusieurs types de molécules incluant l'acriflavine, β -lactamines, sels biliaires, chloramphénicol, Crystal violet, bromure d'éthidium, acides gras, macrolides, solvants organiques, fluoroquinolones(**Kumar, A., Schweizer, H.P., 2005**) . AcrA est la MFP, c'est une lipoprotéine périplasmique attachée à la membrane interne et interagit avec AcrB et TolC (**Masi, M., et al., 2003**). TolC est une porine de la membrane externe. Elle forme un canal dans la membrane externe, prolongée par un tunnel périplasmique qui fonctionne comme un pont avec AcrB (**Masi, M., et al., 2003**). AcrR réprime la transcription de l'opéron acrAB et prévient ainsi une hyperproduction d'AcrAB (**Kumar, A., Schweizer, H.P., 2005**).

1.1.4.1.2. Résistance enzymatique :

A. Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages »:

Historiquement, quatre groupes des entérobactéries avaient été définis sur la base du phénotype de résistance naturelle aux β -lactamines. Depuis la création de nouveaux groupes a été proposée suite à l'évolution de la taxonomie et des connaissances dans le domaine des β -lactamases. Ainsi, 7 groupes des entérobactéries peuvent être différenciés (Tableau 3) (**Philippon, A, Arlet, B., 2012**) :

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

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

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

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

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

Groupe 5 : (céfuroximase inductible) : rassemble les espèces produisant une enzyme chromosomique, sensible aux inhibiteurs, inductible et ayant un spectre d'activité hydrolytique proche de celui des BLSE. Ils présentent naturellement une résistance aux aminopénicillines, aux C1G et au céfuroxime, ainsi qu'une sensibilité aux associations d'aminopénicillines et d'inhibiteurs (**Philippon, A, Arlet, B., 2012**).

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

Tableau N°3 : Phénotypes de résistance naturelle des Entérobactéries (**Philippon, A, Arlet, B., 2012**)

Entérobactéries: phénotype de résistance naturelle	
Première approche phénotypique	Nouvelle approche phénotypique
Groupe 0	<i>P.mirabilis, Salmonella sp</i>
Groupe 1 : <i>E. coli, P. mirabilis, Shigella sp., Salmonella sp.</i>	<i>E. coli, Shigella sp.</i>
Groupe 2 : <i>K. pneumoniae, K. oxytoca, E. hermannii</i>	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca, C. koseri L. malonatica, C. arnalonaticus</i>
Groupe 3: <i>C.freundii, E. cloacae ,E. aerogenes, S. marcescens, E. Agglomerans, E. hafniae, P. retigeri, P. stuartii, P. vulgaris</i>	<i>C. freundii, E. cloacae, E. aerogenes, M. morganii, P.agglomerans, E. hafniae, P. retigeri, P. stuartii</i>
Groupe 4 : <i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. enterocolitica, S. fonticola</i>
Groupe 5	<i>P. vulgaris, P.penneri</i>
Groupe 6	<i>K. ascorbata, K. cryocrescens,K. Georgiana, R. aqualitilis, E. persicina</i>

B. Résistance acquise ou phénotypes « résistants »:

Toutes les entérobactéries, quel que soit leur groupe, sont capables d'intégrer des gènes de résistance codant pour une β -lactamase (**Zogheib, E., Dupont, H., 2005**).

B.1. Pénicillinase de haut niveau ou « pénicillinase acquise » :

Les pénicillinases des entérobactéries sont nombreuses (TEM-1, TEM-2, SHV-1...) et non inductibles. Environ 75% de bêta-lactamases isolées des entérobactéries sont des TEM-1. Ces enzymes sont codées par des plasmides et donc facilement transférables. Elles confèrent aux bactéries, qui les produisent à haut niveau, une résistance aux amino-pénicillines, carboxy-pénicillines, uréido-pénicillines, amidinopénicillines, C1G et C2G (**Collignon, A., et al., 2007**).

B.2. Pénicillinase résistante aux inhibiteurs :

Plus récemment, des bêta-lactamases dérivées de pénicillinases plasmidiques entraînant une résistance aux inhibiteurs suicides de bêta-lactamases ont été décrites. Elles sont produites par *E. coli*, *Proteus* et *Klebsiella*. Elles confèrent une résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline, seules ou en association avec l'acide clavulanique et un bas niveau de résistance aux C1G. (**Lavigne, J.P., et al., 2002**).

B.3. Bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) :

les BLSE sont des β -lactamases de classe A (comme TEM1/2 et SHV-1), et selon la classification de Bush-Jacoby- Medeiros, les BLSE font aussi partie du groupe 2be, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} (ex. céfotaxime, ceftazidime) et 4^{ème} (ex. céfèpime) génération et les monobactames (ex. aztréonam) (**Livermore, D.M., 2008**). Par contre, les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines (ex. céfoxitine) et aux carbapénèmes (ex. imipénème). Enfin, les BLSE sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (I β L), comme l'acide clavulanique (**Livermore, D.M., 2008**). Au laboratoire, la détection des BLSE est classiquement basée sur l'observation d'une synergie entre l'acide clavulanique et les C3G, C4G ou l'aztréonam, et une sensibilité conservée à la céfoxitine et à l'imipénème (**Bradford P.A., 2001, Paterson D.L., 2006**).

Plus de 200 BLSE naturelles ont été décrites; elles ont été classées en 11 familles différentes : TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA (**Vidon , O. , Bourdin, C., 2005**). Les 4 familles majeures : TEM, SHV, OXA et CTX-M (**Gniadkowski, M., 2001**).

B.4. Phénotype « Hyper OXY » :

Chez *K. oxytoca*, des mutations ponctuelles dans la région du promoteur de transcription des enzymes chromosomiques K1 (type OXY-1/OXY-2) conduisent à une résistance de haut niveau

aux pénicillines, aux C1 et 2 G, ainsi qu'à l'aztréonam. Dans ce cas, une synergie peut être détectée entre les C3G ou l'aztréonam, et le clavulanate (**Sougakoff, W., Trystram, D. 2003**).

B.5. Phénotype « céphalosporinase de haut niveau » :

Les céphalosporinases sont des β -lactamases de la classe C, avec un phénotype de résistance est identique à celui des céphalosporinases hyperproduites qui se traduit généralement par une résistance aux C3G, associé avec une résistance à l'acide clavulanique et souvent à la céfoxidine, à l'exception de l'imipénème (**Philippon, A., et al., 2002**). Il s'agit d'un phénotype retrouvé principalement chez les bactéries possédant naturellement une céphalosporinase ampC qui peut être alors surexprimée (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, autres entérobactéries du même groupe). L'expression de cette céphalosporinase est médiée par Amp-C (**Hanson, N.D., 2003**). Chez *Klebsiella pneumoniae*, cette résistance a été décrite pour la première fois avec MIR-1 en 1988, aux États-Unis (**Philippon, A., et al., 2002**). La première enzyme de type DHA a été identifiée en 1992 à Dhahran, en Arabie Saoudite, chez une souche clinique de *Salmonella enterica* sérotype Enteritidis (**Gaillot, O., et al., 1997** ; **Fortineau, N., et al., 2001**). Récemment, pour plusieurs de ces enzymes transférables, les progéniteurs ont été identifiés : groupe BIL-1, CMY-2, LAT-1,2 dérivées de *Citrobacter freundii*, DHA-1 (*Morganella morganii*), MIR-1, ACT-1 (*E. cloacae*), et ACC-1 (*Hafnia alvei*) (**Philippon, A., et al., 2002**).

B.6. Résistance par production des carbapénemases :

Les carbapénémases sont des β -lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. Ces enzymes appartiennent à trois classes selon la classification d'Ambler (**Nordmann P., Carrer A., 2010**) :

- **Classe A :**

Les carbapénémases de classe A ont été tout d'abord rapportées dans plusieurs souches des entérobactéries isolées de l'environnement (*Serratia*, *Enterobacter*), produisant des bétalactamases dont l'activité était inhibée par l'acide clavulanique. Elles hydrolysaient, à divers degrés, toutes les bétalactamines (**Adeline B., et al., 2012**).

Chez les entérobactéries, une variété de carbapénémase de classe A a été décrite: certaines sont chromosomiques (AMNC, Sme, IMI-1, SFC-1) et d'autres sont plasmidiques (KPC, IMI-2, GES et leurs dérivés tels que GES-1, Ges- 2, GES-4, et GES-5 ont été identifiées chez *K. pneumoniae* et *E. coli*) (**Queenan, A.M., Buush, K., et al., 2007**) . Il s'agit de

carbapénémase de structure très similaire à la BLSE c'est le GES-1, dont elles ne diffèrent que par de simples changements ponctuels d'acides aminés qui expliquent l'élargissement de leur spectre de substrat. (**Nordmann, P., et al., 2012**)

Les carbapénémases de classe A, les plus fréquentes et les plus menaçantes, sont les carbapénémases de type KPC (KPC-2 à KPC-8). Leur activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam (**Vaux, S., et al., 2011**), Treize variantes de KPC sont connues à ce jour; KPC-2 et KPC-3 sont les variantes les plus fréquentes dans le monde entier, (**Pfeifer, Y., et al., 2010**). Le plus souvent les souches qui produisent KPC expriment également d'autres bêta-lactamases dont de nombreux types de BLSE et possèdent un certain degré de résistance par imperméabilité. Les souches KPC apparaissent donc le plus souvent multi résistantes aux bêta-lactamines, l'ertapénème étant le carbapénème dont le niveau de résistance est le plus élevé (**Vaux, S., et al., 2011**). La première souche exprimant KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase) fut identifiée dans une souche de *Klebsiella* en Caroline du Nord aux États - Unis en 1996 (**Yigit, H., et al., 2001**), Les producteurs du KPC sont répandus dans le monde entier et deviennent un problème majeur de santé publique et clinique (**Nordmann, P., et al., 2009**).

- **Classe B :**

Les premières carbapénémases de classe B (IMP :Imipénémase) (ou métallobêta- lactamases, MBL) avaient été identifiées dans des espèces des entérobactéries typiquement hospitalières (*Serratia*, *Citrobacter* et *Enterobacter*) au Japon (**Queenan, A.M., Bush, K., et al., 2007 ; Walsh, T.R., 2008**) (Tableau 4). Puis d'autres MBL ont été isolées dans des entérobactéries, dans le monde entier ; il s'agit des nombreuses variétés de bêta-lactamases de type IMP et VIM(Verona Integron encoded Metallo-bêta-lactamase), GIM-1, KHM-1 et NDM-1(New Delhi metallo-bêta-lactamase 1) (**Walsh,T.R., 2008, Yong D., et al., 2009**) (Tableau 4) . Ces enzymes hydrolysent très fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité *in vitro* n'est pas affectée par les inhibiteurs suicides de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam). Ce sont des métallo-enzymes qui contiennent un ion zinc dans leur site actif expliquant l'inhibition de leur activité par l'EDTA (chélateur des cations divalents) ou l'acide dipicolinique. (**Adeline, B., et al., 2012**).

Tableau N°4 : Métallo-bêta-lactamases décrites chez les entérobactéries dans le monde : (Nordmann, P., Carrer., A, 2010).

Enzyme	Espèce	Pays
IMP-1	<i>S. marcescens, K. pneumoniae, K. oxytoca, E. coli, E. cloacae, E. aerogenes, C. freundii, M. morganii, P. rettgeri, K. pneumoniae</i>	Japon, Brésil, Turquie
IMP-3	<i>S. flexneri</i>	Japon
	<i>C. youngae</i>	Chine
IMP-4	<i>K. pneumoniae, E. coli</i>	Australie, Chine
IMP-6	<i>S. marcescens</i>	Japon
IMP-8	<i>K. pneumoniae, E. cloacae</i>	Taiwan
IMP-10	<i>S. marcescens</i>	Japon
VIM-1	<i>E. coli</i>	Grèce, Espagne, Italie
	<i>K. pneumoniae</i>	France, Allemagne, Grèce
	<i>P. mirabilis</i>	Italie, Grèce
	<i>E. cloacae, E. aerogenes</i>	Italie, Grèce, Espagne
	<i>C. freundii</i>	Grèce, Allemagne
	<i>P. stuartii</i>	Grèce
	<i>M. morganii</i>	Grèce
	<i>E. coli</i>	Grèce
	<i>E. cloacae, S. marcescens</i>	Corée
VIM-2	<i>C. freundii</i>	Taiwan

	<i>P. stuartii</i>	Corée
	<i>K. oxytoca</i>	Portugal
VIM-3	<i>C. freundii</i>	Taiwan
	<i>E. cloacae</i>	Grèce, Italie
VIM-4	<i>K. pneumoniae</i>	Tunisie, Italie
VIM-5	<i>K. pneumoniae, E. cloacae</i>	Turquie
VIM-12	<i>K. pneumoniae</i>	Grèce
KHM-1	<i>Citrobacter freundii</i>	Japon
NDM-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inde, Pakistan
	<i>E. coli</i>	Grande-Bretagne
NDM-4	<i>E. coli</i>	Inde
NDM-7	<i>E. coli</i>	Burma

- **Classe D :**

La carbapénémase de classe D, également nommée OXAs pour oxacillinases comprenant 232 enzymes (OXA-48, OXA-163, OXA-181) avec quelques variantes possédant la même activité de carbapenemase (**Nordmann, P., et al., 2012**). Initialement OXA a été signalée par *P. aeruginosa*, mais jusqu'à présent, ces carbapénémases ont été détectées dans les bactéries Gram-négatif, y compris les entérobactéries. (**Pfeifer, Y., et al., 2010**).

La carbapénémase de classe D, OXA-48 décrite tout d'abord chez *K. pneumoniae* (**Poirel, L., et al., 2004**), par la suite les souches productrices d'OXA-48 ont été largement rapportées en tant que sources d'épidémies nosocomiales dans de nombreuses régions du monde notamment dans les pays méditerranéens (**Carrér, A., et al., 2010, Benouda, A., et al., 2010**) : Croatie, Égypte, France, Grèce, Israël, Italie, Liban, Libye, Slovénie, Espagne, Tunisie et Turquie, Maroc (**Djahmi, N., et al., 2014**) . Cette carbapénémase hydrolyse par contre, beaucoup plus fortement les carbapénèmes et n'hydrolyse pas les céphalosporines de 3e génération. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (**Poirel, L., et al., 2004**) . OXA-48 est souvent associée à d'autres bétalactamases en particulier des BLSEs , ce qui contribue à la multirésistance des souches (**Gülmez D., et al., 2008 ; Carrér, A., et al., 2010**). En l'absence d'autres bêta-lactamases, les souches qui ne produisent que OXA-48 peuvent ne présenter qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes (**Aktas, Z., et al., 2008**) . Le gène d'OXA-48 est localisé au sein d'un transposon comportant deux séquences d'insertion identiques assurant mobilité et expression (**Poirel, L., et al., 2004**). Plus récemment, des souches produisant une oxacillinase similaire, OXA-181, ont été isolées en Inde ou chez des patients d'origine indienne (**Castanheira M., et al., 2011**) .

1.1.4.2. Mécanismes de résistance aux Aminosides ou Aminoglycosides :

Trois principaux mécanismes de résistance aux aminosides sont employés par les entérobactéries :

- ✓ **Diminution d'entrée:** La résistance aux aminoglycosides consécutive à une diminution de l'entrée, peut être intrinsèque ou acquise. La diffusion d'aminoglycosides à travers la membrane cytoplasmique peut être réduite par le potentiel électrique établi par le système de transport d'électrons qui réduit la concentration intracellulaire de ces composés (**Roy, D., 2000**).
- ✓ **Altération de la cible:** La résistance aux aminoglycosides peut être conférée par différents changements mutationnels de leur cible (**Roy, D., 2000**). Récemment une série

des méthylases qui protègent l'ARNr 16S est identifiée chez plusieurs pathogènes nosocomiaux tels que *K. pneumoniae*, et *S.marcescens* (**Yamane, K., et al., 2005**). Ces enzymes confèrent une résistance de haut niveau aux l'amikacine, la tobramycine et la gentamicine (**Doil, Y., Arakawa Y., 2007**). Ces dernières années cinq méthylases de l'ARNr 16S ont été identifiées : **ArmA** (Resistance methylase transferase): chez *Citrobacter freundii* isolées en Pologne en 2002, Puis 2003 chez *K. pneumoniae* en France, **RmtA** : L'analyse de l'environnement génétique du gène *rmtA* a démontré qu'il est associé à un transposon codant pour la résistance au mercure *Tn 5041* (**Yamane, K., et al., 2005**) sur un plasmide transférable, **RmtB** : chez *Serratia marcescens* au Japon en 2004 , **RmtC** : identifié pour la première fois chez *Proteus mirabilis* au Japon et **RmtD** :La séquence en acides aminés de cette protéine présente de 40% à 42% d'homologie avec RmtA et RmtB (**Doil, Y., Arakawa Y., 2007**).

- ✓ **Inactivation enzymatique:** Cette modification structurale consiste en l'ajout d'un groupement sur les positions aminées ou hydroxylées des aminoglycosides ce qui empêche leur fixation sur le site A. Ce groupement peut être un groupement nucléotidyl pour les aminoglycosides O-nucléotidyltransférases (ANT), un groupement phosphoryl pour les aminoglycosides O-phosphotransférases (APH) ou enfin un groupement acétyl pour les aminoglycosides N-acétyltransférases (AAC).

En Algérie, les gènes *aac(3)-II*, *aac(60)-Ib* ont été identifiés chez des souches cliniques des entérobactéries sur des plasmides associés aux gènes codant pour les types CTX-M-3, CTX-M-15 et CTX-M- 28 et les gènes *qnrB*.(**Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Arlet, G., 2014**). D'autres gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés en Algérie. (Tableau 5)

Tableau N°5: Déterminants de résistance aux aminosides, aux quinolones en Algérie

Enzymes décrités	Espèces concernées	Lieu	Références
ArmA	<i>Enterobacteriaceae</i>	NP	Bogaerts, P., et al., 2007
QnrB	<i>Enterobacter cloacae</i>	Béjaia	Touati, A., et al., 2008
QnrB, QnrB4, QnrS1	<i>E. cloacae</i>	Alger, Tizi-Ouzou , Tlemcen	Iabadene, H., et al., 2008
AAC[30]-II	<i>Salmonella enterica</i>	Tizi-Ouzou	Iabadene, H., et al., 2009
QnrB1 , AAC[60]-Ib	<i>Enterobacter cloacae</i>	Annaba	Meradi, L., et al., 2011
AAC[60]-Ib-cr			
ArmA	<i>S. enterica</i>	Constantine	Naas, T., et al., 2009 ; Naas, T., et al., 2011
ArmA	<i>Salmonella non-Typhi</i>	Annaba	Bouzidi, N., et al., 2011
QnrB1 ,QnrS1 , AAC[60]-Ib-cr	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i>	Béjaia	Gharout-Sait, A., et al., 2012
AAC[30]-II, AAC[60]-Ib-cr, QnrB2 , aadA2	<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i>	Tlemcen	Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., et al., 2013
ArmA, AAC[6]-Ib-cr, aadA2, aadA1, APH(3)vib, QnrB42	<i>Serratia marcescens</i>	Est algérien	Batah, R., et al ., 2015
ArmA, AAC[6]-Ic, aad(A1 , A2) ,QnrB42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Annaba	Belbel, Z., et al., 2014
AAC[60]-Ib-cr, aad(A1 , A2), ArmA, ant(2")-Ia	<i>Enterobacter spp.</i>	Est algérien	Khenouchi, N.C. , et al., 2015
aadA2	<i>E. coli</i>	Annaba	Sacci, A., et al., 2014

NP : non précise

1.1.4.3. Mécanismes de résistance aux Quinolones :

La résistance aux quinolones est principalement chromosomique, généralement due à une diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Ceci est dû à une modification de l'ADN gyrase et/ou de la topoisomérase IV par mutations ponctuelles.

La résistance des entérobactéries aux quinolones est liée non seulement à des mécanismes de résistance de support chromosomique transmissible verticalement mais aussi à des gènes de support plasmidique transférable horizontalement.

En Algérie, Les gènes plasmidiques qnr (-A, -B, -S) ont été détectés chez des souches hospitalières des entérobactéries produisant des BLSE (CTX-M, SHV-12 et VEB-1) . Plus récemment, les gènes qnr ont été isolés à Bejaia chez des souches d'*E. coli* produisant des BLSE de type CTX-M et responsables d'infections urinaires en milieu communautaire, ensuite la detection de gène *aac(6')-Ib* pour la première en 2009 fois chez une souche d'*E. cloacae* . Depuis, deux autres études ont rapporté la présence de ce gène aussi bien en milieu hospitalier que communautaire (**Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Arlet, G., 2013**) (Tableau 5)

1.1.5. Epidémiologie :

Malgré des incidences variables, la diffusion des entérobactéries responsables d'épidémies hospitalières et infections communautaires concerne actuellement toutes les régions du monde. Leur incidence est plus forte dans les pays en développement, particulièrement en Asie du sud-est, Afrique et Amérique du sud. Il existe différents réseaux de surveillance des résistances bactériennes à travers le monde, grâce auxquels il est possible d'avoir un point de vue global sur l'incidence des bactéries productrices des gènes de résistance et leur épidémiologie, c'est pour cela que dans cette partie nous avons essayé de connaître l'émergence de l'épidémie de cette bactéries dans plusieurs pays du monde sur plusieurs périodes.

1.1.5.1 A l'échelle mondiale :

A. En Europe :

• France :

Le laboratoire d'hygiène hospitalière du CHU de Brest, en 03 janvier 1996 a isolé une souche d'*Enterobacter aerogenes* sécrétrice d'une céphalosporinase à partir du lait maternel d'une mère d'enfant hospitalisé en néonatalogie. Le 15 avril 1996 une nouvelle souche d'*E. aerogenes* est isolée du lait maternel d'une autre mère. Jusqu'au 18 août 1997, 21 échantillons de lait maternel ont été positifs pour cette bactérie . Pendant la même période, *E. aerogenes* a été isolé chez 26 enfants de moins d'un an, dont 11 étaient infectés et 15 colonisés (**Burnichon, G., et al., 2004**).

En 1996 à l'Hôpital Lariboisière à Paris, 18 à 50% des septicémies à point de départ respiratoire ou veineux qui se rencontrent surtout en réanimation chez des patients aux

antécédents lourds sont provoquées par *Enterobacter* sp. (**Guerin, J. M., 1996**). Au cours de l'année 2003, les données de l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) en France, déclarent que 49 % des bactériémies sont provoquées par les entérobactéries. (Bertrand, X., et al., 2005) *E. coli* domine le profil épidémiologique (69 à 77 %) (Cavallo, J.D., et al., 2003).

En 2008, la publication de Levy et al. sur l'observation national des méningites bactériennes de l'enfant en France qui ont été effectuées sur 252 services de pédiatrie, et 168 services de microbiologie depuis 2001 jusqu'à 2007, montre que 237 services de pédiatrie ont inclus 2951 cas de méningites tous germes confondus . Le nombre total de bactéries isolées a varié de 452 (années 2001 et 2003) à 378 (année 2004). Le méningocoque représentait près de la moitié des cas de méningites de l'enfant (46 %) et le pneumocoque près du tiers (28 %). Les méningites à *Haemophilus influenzae* étaient peu nombreuses (3 %). Le streptocoque du groupe B et *E. coli* étaient les deux premières bactéries retrouvées en période néonatale et le taux de mortalité a varié selon la bactérie, 6,6 % pour *E.coli*, 11,6 % pour le streptocoque du groupe B . (Levy, C., et al., 2008).

Selon une étude faite par Carabalona et al. (Janvier 2011 à Décembre 2013) portée sur les Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique en neuro-réanimation, Deux cent quarante patients ont été inclus (79 femmes, 161 hommes). Les pathologies rencontrées étaient: traumatismes crâniens graves, $n = 97$, hémorragies sous-arachnoïdiennes, $n = 62$, accidents vasculaires cérébraux hémorragiques, $n = 47$ et ischémiques, $n = 13$, autres pathologies neurologiques, $n = 21$, Les prélèvements bactériologiques ont révélé la présence de : (*Enterobacter aerogenes* $n = 5$, *Serratia* $n = 5$, *Escherichia coli* $n = 4$, *Proteus mirabilis* $n = 2$, *Morganella* $n = 2$, *Enterobacter cloacae* $n = 1$, *Klebsiella pneumoniae* $n = 1$, *Citrobacter* $n = 1$, *Providentia* $n = 1$, *Moraxella catharallis* $n = 1$), parmi d'autres espèces isolées (**Carabalona, J.F., et al., 2014**).

- **Suisse :**

ANRESIS (Centre suisse pour le contrôle de l'antibiorésistance, www.anresis.ch) a rapporté 65 isolats d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes développant des infections sévères en 2011, contre 46 souches en 2010 et 27 en 2009. Parmi ces isolats un rapport publié en 2012 rapporte les cas de quatre patients hospitalisés aux Hôpitaux universitaires de Genève (HUG) entre octobre 2009 et novembre 2011, qui développaient des infections sévères , **1^{ère} Patient** :Victime d'un accident de voiture avec polytraumatisme, hospitalisé en Inde pendant

trois jours, puis transféré aux HUG. Le dépistage à l'admission a révélé le portage d'une souche d'*Escherichia coli* exprimant une (BLSE) et une autre souche d'*A. baumannii* portant le gène *bla*_{NDM-1}. **2^{ème} Patient** : Victime d'un attentat terroriste à la bombe au Pakistan, sévèrement blessé, transféré aux HUG après une hospitalisation de cinq jours au Pakistan. A l'admission, le dépistage révèle le portage d'une souche d'*A. baumannii* multirésistante et d'une souche d'*Enterobacter cloacae* de type BLSE. **3^{ème} Patient** : Patiente transférée à Annemasse un hôpital de Belgrade, puis aux HUG pour suite de prise en charge d'un accident vasculaire cérébral ischémique. A l'admission, on note une infection urinaire basse avec culture, mettant en évidence une *K. pneumoniae* *bla*_{NDM-1} et aussi de *P. mirabilis* de type BLSE. **4^{ème} Patient** : Patient domicilié en Italie du Sud sans anamnèse d'hospitalisation dans les dix dernières années, admis aux HUG pour sigmoïdectomie et suture vésicale élective pour fistule entérovésicale sur diverticulose sévère. La culture d'urines à l'admission met en évidence une *K. pneumoniae* *bla*_{KPC}, Développement d'une infection du site opératoire. (**Fankhauser, C., et al., 2011**)

B. En Amérique :

Une étude rétrospective en 1990 a été réalisée sur tous les cas diagnostiqués de méningite néonatale à l'hôpital Infantile de Mexico Federico Gomez Mexique. Un taux de 9,6 cas pour 1000 patients sortants a été trouvé ainsi une association de 6,7% à la septicémie. Dans 50 des cas analysés, un agent étiologique a été identifié chez 23 enfants; les principales bactéries ont été identifiées *Escherichia coli* (24%), *Klebsiella pneumoniae* (14%), *Enterobacter* (4%), *Proteus mirabilis* (2%) (**Sanchez-saucedo, L. U., et al., 1990**).

Les espèces du genre *Enterobacter* sont souvent rencontrées dans les unités de soins intensifs et sont à l'origine de 8,6 % des infections nosocomiales, selon les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) des Etats-Unis (**Boyce, T. G., et al., 2004**) . Les espèces du genre *Enterobacter* sont également en cause dans une proportion considérable de cas signalés de bactériémie; dans un hôpital pédiatrique, il a été montré que les souches d'*Enterobacter* étaient la cause la plus fréquente des cas de bactériémie, comptant pour 14 % des cas(**Boyce, T. G., et al., 2004**) , alors que chez les adultes, les espèces du genre *Enterobacter* sont à l'origine de 1,5 à 6 % des bactériémies (**Hart, C. A., 2006**) . Entre 1970 et 1971, une épidémie de septicémie a été causée par des produits intraveineux contaminés; 378 patients de partout aux États-Unis ont été infectés (**Maki, D. G., et al., 1976**).

En 2000, la première épidémie de KPC (*Klebsiella* productrice de carbapénémase) s'est produite dans la région de New York , et depuis lors, une augmentation progressive de l'incidence a été mise en évidence. En 2009, KPC a été retrouvée dans vingt Etats américains, signe d'une

propagation rapide (**Nordmann, P, et al., 2009**). La première épidémie de KPC en dehors des Etats-Unis a eu lieu en Israël en 2004 . A partir de 2007, KPC a été retrouvée en Grèce et selon certaines données, la situation y est endémique, avec environ 40% des isolats de *K. pneumoniae* produisant une KPC (65% dans certains hôpitaux à Athènes)(**Giakkoupi, P., et al., 2001**). La quasi-totalité des infections décrites à KPC sont nosocomiales, mais des cas d'infection acquise en communauté ont été décrits en Israël (**Nordmann, P., et al., 2011**) le patient que nous décrivons n'avait pas d'anamnèse de voyage ni d'hospitalisation récente, ce qui suggère une acquisition communautaire de la souche. La mortalité attribuée aux infections sévères par des bactéries productrices KPC est élevée (50%) (**Nordmann P, et al., 2011**).

Pendant la période allant de 2009 à 2011, en Amérique du Nord, 9,7% d'infections dans les services de soins intensifs sont provoquées par *E. coli* et 10,7% par *K. pneumoniae* (**Sader ,H. S., et al., 2013**).

Au Canada, Les premiers cas de KPC ont été rapportés à Ottawa chez trois patients d'un même hôpital. Deux d'entre eux étaient reliés épidémiologiquement (**Goldfarb, D., et al., 2009**). Au Québec, depuis décembre 2009, quatorze souches productrices de KPC (7 *Escherichia coli*, 3 *Serratia marcescens*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Klebsiella pneumoniae* et 1 *Citrobacter freundii*) ont été identifiées à partir de onze patients isolés dans trois centres hospitalier différents. Un lien épidémiologique a été établi pour cinq d'entre eux porteurs d'*E. coli*, et pour trois porteurs de *S. marcescens* (**Goldfarb, D., et al., 2009**).

En pédiatre en 2012, 4,4% des bactériémies a *E. coli* a été rapportée en Suède , 13,5% en Espagne, 26,3% en Italie et le plus fort taux était retrouvé en Bulgarie avec un pourcentage de 38,1% . Comparativement aux prévalences observées en 2000 dans ces mêmes pays, on note une progression majeure par les souches d'*E. coli*, qui ne semble épargner aucun pays (<http://www.ecdc.europa.eu>).

C. Asie :

En 2010, un réseau de surveillance incluant 11 pays (Malaisie, Chine ...) d'Asie (SMART) retrouvait un pourcentage de 40.7% et 21,4% des infections sont provoquées par *E. coli* et *K. pneumoniae* respectivement en milieu hospitalier. (**Hsueh, P.R., 2012**).

En Taiwan, dans le centre médical du nord, 138 souches de *S. marcescens* collectées pendant 1998 et 2002 provenant des prélèvements urinaires étaient responsables d'infection nosocomiale du tractus urinaire (**Liou, B.H., et al., 2014**).

Selon la publication de Nordmann et Carrer, NDM-1 est l'une des métallo-bêta-lactamases les plus récemment décrites, Elle aurait une diffusion importante, identifiée en Inde, au Pakistan et en Grande-Bretagne chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en milieu hospitalier et également en milieu communautaire. Les taux de mortalité associés aux infections dues à ces entérobactéries produisant des métallo-bêta-lactamases varient de 18,8 % à 66,7 %. (**Nordmann, P. , Carrer A. , 2010**).

Au Japon la première IMP a été décrite en 1991. Depuis, ce type d'enzyme est désormais endémique en Taiwan et au Japon (**Walsh, T.R., 2010**).

D. En Afrique :

- **Tunisie :**

Selon la publication de Ben salah en 2002, une étude rétrospective portant sur 195 septicémies effectuée dans l'Hôpital Tunisien entre 1996-1998, montre que les *Klebsiella - Enterobacter - Serratia* (KES) sont les isolats les plus fréquemment isolés dans ces septicémies et que la mortalité globale est de pourcentage 18% (**Ben salah, D., et al., 2002**).

Une autre étude prospective d'incidence portant sur 340 patients admis en 2004 et séjournant plus de 48 heures en réanimation, dont 249 (73 %) nouveau-nés, 22 épisodes infectieux bactériens ont été enregistrés chez 22 patients. L'incidence des infections bactériennes nosocomiales était de 6,5 % et la densité d'incidence de 7,8 pour 1000 jours d'hospitalisation. Deux sites infectieux ont été identifiés : les bactériémies (68,2 %) et les pneumopathies (31,8 %). Pour les pneumopathies les bacilles à Gram négatif étaient les bactéries les plus fréquemment isolées (68 %) et étaient dominés par *Klebsiella pneumoniae* (22,7 %). Le prédominant des bactériémies était *K. pneumoniae* (26,7 %), multirésistante dans 85 % des cas (**Ben Jaballah, N., et al., 2006**).

Sur une période de 3 ans et demi (Juillet 2009–Décembre 2012), une étude rétrospective effectuée au laboratoire de microbiologie du CHU Fattouma-Bourguiba de Monastir, portant sur 175 BMR isolées au service de néonatalogie, essentiellement d'hémoculture (36 % des cas). Les entérobactéries résistantes aux C3G étaient les plus fréquentes ($n = 141$). *K. pneumoniae* était l'espèce majoritaire (107 souches) (**Kooli, I., et al., 2014**)

- **Maroc :**

Dans l'Hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès, entre Octobre 2006 au Octobre 2008 au service d'urologie et des consultants externes, sur 6000 échantillons urinaires, 730 répondaient

aux critères d'infection urinaire (12,2 %), parmi les infections 30 % provenaient des patients hospitalisés et 70 % de patients consultant en ambulatoire. L'espèce *E.coli* domine le profil épidémiologique aussi bien pour les entérobactéries hospitalières que communautaires avec respectivement 65 et 80 % des isolats (**Lahlou , A. , I. , 2010**).

Une étude rétrospective d'une durée de 3 ans (octobre 2006 à fin Septembre 2009) relatant l'épidémiologie des infections bactériennes multi résistantes isolées à l'unité de réanimation de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech (HMA), montre que 84 isolats cliniques de bactéries multi résistantes ont été isolés à partir de 414 produits pathologiques .Parmi ces isolats , 34 sont des entérobactéries représentées par *K. pneumoniae* (22 isolats), suivi d'*E. coli* (n=7), de *Proteus mirabilis* (n=2), d'*E. cloacae* (n= 2) et *Citrobacter freundii* (n=1) et les sites infectieux à ces bactéries sont les suivants : les pneumonies (30 %), les suppurations (21%), les infections urinaires (17%), les pleurésies (15%), les sepsis (12%) et les méningites nosocomiales (5%) (**Arsalane, L., et al., 2010**).

Barguigua, pendant l'année 2011 à l'hôpital universitaire de Casablanca sur 166 *Klebsiella pneumoniae*, 2 souches ont causée plusieurs infections sévères au sein de l'hôpital (souches productrices de OXA-48 et NDM-1) (**Barguigua, A., et al., 2015**).

- **Burkina faso :**

En 2011 , une étude transversale rétrospective sur 4 ans a été réalisée , incluant tous les enfants hospitalisés de moins de 15 ans, chez des prélèvements qui ont été effectués pour le diagnostic étiologique d'une infection ostéo-articulaire. Les résultats montrent la prédominance des entérobactéries 42,5% et les bacilles à Gram négatif non entérobactéries 5%. La répartition par espèce montrait la prédominance de *Staphylococcus aureus* (42,5%) suivi par *Proteus mirabilis* (12,5%) et *E. coli* (7,5%) (**Ouedraogo, A.S., et al., 2011**).

- **Sénégal :**

Selon la publication de Diene en 2014, à l'hôpital principal de Dakar 112 souches cliniques ont été détectées , parmi ces isolats *Morganella morganii* (souches productrices de CTXM-15) sont responsables de 4% des infections urinaires (**Diene 1, S.M., et al., 2014**)

1.1.5.2. A l'échelle Nationale :

Une étude prospective, sur une période continue de trois années (2007–2009), dans un service de réanimation pédiatrique polyvalente médico-chirurgicale de dix postes de CHU Hussein-Dey

Alger, 1 360 enfants ont été inclus dans cette étude (7 560 journées d'hospitalisation). Sur 143 souches : 108 étaient Gram négatif (75,52 %) dont 41 étaient producteurs de BLSE (38 %), avec une forte incidence en 2009 (44,73 %). L'isolat le plus fréquemment isolé est *Klebsiella pneumoniae* (60 %) et *Serratia* (4 %). et de l'*Enterobacter* (4 %). Les BGN producteurs de BLSE sont responsables d'une infection au cours des soins dans 14 cas (34,15 %) et communautaires dans 27 cas (65,85 %). Les bactériémies sont les sites infectieux prédominants (54,05 %). Ces isolats sont responsables d'une mortalité directe ou indirecte de l'ordre de 45,16 %. (**Thamlaoui, M., et al., 2011**).

Une étude descriptive rétrospective des enfants admis au service de pneumologie de l'hôpital d'enfants d'Oran (Algérie) entre septembre 2013 et août 2014 a été réalisée sur Quarante six patients, l'âge moyen était de $3,2 \pm 3,2$ ans [0,1–12,7]. La toux chronique a été retrouvée chez 80 % des patients. Les bactéries identifiées à l'ECBC (l'examen cytobactériologique des crachats) étaient : *Klebsiella* 41,3 %, *Enterobacter* 19,7 %, *Proteus* 13 %, *Serratia* 6,5 %, *E. coli* 6,5 %. Les pathologies sous-jacentes étaient connues chez 65 % des patients (5 déficits immunitaires, 5 bronchiolites post-infectieuses, 5 dilatations de bronches, 3 maladies ciliaires, 2 dyskinésies trachéo-bronchiques, 2 séquestrations pulmonaires, 2 maladies de surcharge, 2 pneumopathies d'inhalation, 1 mucoviscidose, 1 hémosidérose, 1 myopathie, 1 poumon rachitique) (**Radou, A., et al., 2015**).

Mezhoud , au cours d'une étude qui s'est déroulée pendant la période allant d'Octobre 2010 à Mai 2011 (7 mois), sur 423 souches de bactilles à Gram négatif dont 401 souches d'*Enterobacteriaceae* , l'espèce la plus fréquemment isolée est *E.coli* avec un taux de 72,6 % suivie par *Klebsiella sp.* et *Proteus sp.* avec des taux de 9,67% et 6,38 % responsable des infections urinaires d'origine communautaire. Ce résultat concorde avec l'étude de Medboua durant la période de stage de 8 mois, Novembre 2010-Juin 2011 dans différents services du CHU Beni-Messous Alger, 509 souches sont isolées et identifiées dont 90,37% (460 /509) sont des entérobactéries, 53.44% (272/509) souches chez les patients non hospitalisés et 46.56% (237/509) chez les patients hospitalisés. Parmi les souches isolées en milieu hospitalier, le service de pédiatrie occupe la première place avec 38.51% (196/509) des souches isolées, suivi par 4.13% (21/509) en maternité, *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 52.06%, suivi par *K. pneumoniae* avec des taux de 16,11% (**Mezhoud, H., 2011**).

Selon l'étude de Belbel , sur 100 souches de *K. pneumoniae* collectées durant une période de deux ans (2010 et 2011), à partir de prélèvements bactériologiques reçus au laboratoire central de Microbiologie du CHU Dorban d'Annaba, montre que la plupart des souches a été isolée

essentiellement chez les patients admis à l'hôpital pédiatrique Sainte Thérèse (48%) qui regroupe les services suivants : pédiatrie, réanimation pédiatrique et le service de néonatalogie. Ceci est peut être du à une épidémie et / ou une situation endémique dans l'unité, puisque la majorité des isolats provenaient de ces services dans une courte période. En outre, la catégorie de patients hospitalisés dans cette structure hospitalière est représentée par la population néonatale et pédiatrique. (**Belbel , Z., 2014**).

Batah et collaborateurs , leur travaux sur 54 souches de *S. marcescens* collectées durant une période de 20 mois (Décembre 2011-Aout 2013) à partir de prélèvements bactériologiques d'origine pathologique recueillis de différents établissements de santé au niveau de l'Est algérien montre que 47 souches ont été diagnostiquées dans les urines (87%) et (13%) dans le pus, aussi montre que le service de chirurgie urologique de l'établissement hospitalier spécialisé-d'urologie néphrologie et de transplantation rénale Daksi de Constantine semble être le plus incriminé car 67% des souches proviennent de ce service, elles ont été isolées chez des patients hospitalisés, notons qu'au même établissement un taux de 15% des souches sont des ambulatoires , aussi un taux de 13% des souches ont été isolées de prélèvements des laboratoires privés d'Annaba et 5% ont été enregistrées au service de la néonatalogie de l'établissement hospitalier public de Skikda . globalement le taux d'infection urinaire due à *S. marcescens* dans cette étude est de 87% (**Batah, R., 2016**).

Une épidémie à *Enterobacter spp.* a été détectée en 2013 par Khennouchi et al., dans une clinique d'uro-néphrologie, 14 souches multi résistantes d'*Enterobacter cloacae* complexe ont été isolées chez des patients hospitalisées (**Khennouchi, N.C., et al., 2015**)

1.2. Bacilles à Gram négatif non fermentants :

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation (**Richard, C., Keredjian, M., 1995**).

La position taxonomique des bacilles à Gram négatif non fermentants a subi de nombreux changements ces dernières années, depuis la publication de la liste : « **Approved list of bacterial names** » (**Rockstroh, T., 1977**). Ces changements reposent sur des données phénotypiques comme les caractères conventionnels ou nutritionnels mais surtout génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN (**Richard, C., Keredjian, M., 1995**), ce qui a conduit à l'invention de nouveaux genres. On peut distinguer un certain nombre de genres (*Pseudomonas*,

Burkholderia, Comamonas, Brevundimonas, Acinetobacter, Ralstonia, Shewanella, Agrobacterium, Achromobacter, Chryseomonas, Flavobacterium, Flavimonas, Frateuria, Gluconobacter, Rhizobium, Bordetella, Kingella, Oligella, Protomonas, Xanthomonas). Deux espèces : *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* représentent jusqu'à 75 % de tous les bacilles à Gram négatif isolés dans les laboratoires de Bactériologie médicale et aussi les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs .

1.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* :

1.2.1.1. Historique et Taxonomie :

La classification en genres et espèces à l'intérieur de la famille des *Pseudomonadaceae* a longtemps reposé sur des caractères phénotypiques simples d'orientation. La simplification de cette classification a été réalisée par **Stanier** qui a étudié principalement l'assimilation des substances carbonées, et par **Palleroni** qui a classé les espèces de *Pseudomonas* en 5 groupes génomiques ; les *Pseudomonas* vrais appartenant au groupe I (**Martin, C., 2007**).

En **1850**, Le chirurgien **Charles-Emmanuel Sedillot** fut le premier à observer que la coloration de pansements chirurgicaux a été associée à un agent transmissible (**Lister, P.D., et al., 2009**). C'est en **1869** que **Fordos** a souligné que la coloration était due à un pigment bleu cristallin appelé pyocyanine (**Williams, E.P., Cameron, K., 1894**).

En **1882**, *Pseudomonas aeruginosa* a été décrit pour la première fois par le pharmacien des armées **Carle Gossard** qui, à l'occasion de sa thèse, voulait en étudier le pigment (**Avril et al., 2000**), sous le nom de « bacille pyocyanique ». Le nom est composé du grec « *pseudo* » (imitation) et « *monas* » (unité), « *aeruginosa* » signifie vert-de-gris en latin et se réfère aux pigments que sécrète la bactérie .

L'édition du **BERGERY'S MANUEL** de **1974** retenait 29 espèces d'intérêt médical dans le genre de *Pseudomonas*. En 1984, 30 espèces furent retenues dans le genre *Pseudomonas* , mais c'est seulement avec l'événement de la génétique que de nouvelles espèces et genres ont vu le jour .(**Avril. J. L, et al., 2000**). L'espèce *P. aeruginosa* appartenant a ce genre, du règne *Bacteria*, de la division *Proteobacteria*, au sein de la Classe des *Gammaproteobacteria*, a l'Ordre de *Pseudomonadales*, Famille *Pseudomonadaceae* .

1.2.1.2. Habitat :

Le réservoir naturel de cette bactérie saprophyte est l'eau, les végétaux au contact de cette eau et les sols humides (**Murray, P.R., et al. ,1999**) , peut également vivre à l'état commensal sur la

peau et les muqueuses de l'homme *P. aeruginosa* est apporté par les aliments, expliquant qu'il soit trouvé à faible concentration dans le tube digestif de 4 à 12% des individus sains (**Bodey, G.P., et al., 1983**), ne constituant donc qu'une espèce mineure de la flore intestinale

P. aeruginosa peut aussi se trouver dans le matériel hospitalier, tel que les endoscopes (**Sorin, M., et al., 2001**), les nébuliseurs (**Cobben, N.A., et al., 1996**), les équipements de dialyse (**Yardy, G.W., 2001**), des analyseurs de gaz du sang(**Garland, S.M., et al., 1996**) ou encore les bain-Marie (**Berrouane, Y.F., et al., 2000**) . Ainsi de nombreuses épidémies hospitalières ont été imputées à la contamination de divers équipements et/ou matériels humides. Dans ce cas, la bactérie est censée être transmise directement à partir du réservoir aux patients sans passer par aucun intermédiaire. Mais plusieurs études mettent en avant le personnel médical comme réservoir et vecteur potentiel de *P. aeruginosa*. C'est le cas de Moolenaar et ses collègues qui ont décrité une épidémie liée à des ongles artificiels (**Moolenaar, R.L., et al., 2000**) et McNeil et ses collègues ont rapporté une épidémie liée à la colonisation chronique de l'ongle du pouce d'une infirmière (**McNeil, S.A., 2001**). Cependant, cette voie de diffusion est moins fréquente que les voies habituelles.

1.2.1.3. Caractères bactériologiques :

Ce sont des bacilles à Gram négatif ubiquitaire, non sporulant de forme droite ou légèrement courbée. Ils mesurent de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large (**Euzéby J.P., 2005**) , cultivées facilement sur tous les milieux en aérobiose, ils se présentent de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotrichie (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires) (**Euzéby J.P., 2005**).

La morphologie de *P. aeruginosa* de même que pour tout le genre *Pseudomonas*, est facilement distinctive grâce à la production des pigments notamment : la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (**Khalilzadeh, P., 2009**), aussi la production d'un voile fragile visqueux et peu épais à la surface des milieux liquides avec une odeur aromatique caractéristique (odeur de seringa) . *P. aeruginosa* est une bactérie mésophile capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (**Potvin, E., 2007**). les colonies sont habituellement ce forme : *la* (*large*) : isolées, grandes avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier-Fried Eggs (œufs sur le plat) ou *Sm* (*Small*) : petites, mates légèrement bombées avec un bord circulaire régulier ou *M* (*muqueuse*), bombées, opaques, visqueuses parfois coulantes (**Jean, M., 2004**).

Pseudomonas aeruginosa n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Elle possède une oxydase et plusieurs propriétés biochimiques utiles à son identification (**Lie, S., 2002**). (Tableau6).

Tableau N°6 : Principaux caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*

Tests	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
Résultats	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-

- : Négatif ; + : Positif, ADH : Arginine , ONPG: L'orthonitrophényl-β-galactoside , H₂S : Thiosulfate de sodium , LDC : Lysine, ODC : Ornithine, , URE: Urée, VP : Pyruvate de sodium(réaction de Voges-Proskauer) , GEL : Gélatinase de Khon ,CS : Citrate de sodium, CC : Citrate de Christensen ,IND : Tryptophane, MAL : Maltose, PDA : Phenylalanine deaminase, LAC : lactose, Glu :Glucose, NIT :Potassium nitrate , ESC : Esculine citrate de fer .

1.2.1.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

En tant que bactérie ubiquiste, *P. aeruginosa* est une bactérie capable de s'adapter à différents environnements et est de résister à de nombreuses molécules normalement toxiques pour la croissance bactérienne. Sa résistance naturelle ou acquise aux antibiotiques est une bonne illustration de cette propriété. Trois familles d'antibiotiques peuvent être utilisées pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa* (Bêta-lactamines, Aminosides, Quinolones).Or, pour chacune de ces familles, au moins un mécanisme de résistance a été décrit.

1.2.1.4.1. Mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines :

1.2.1.4.1.1. Résistance naturelle :

Elle est liée à plusieurs mécanismes :

- ✓ Production d'une céphalosporinase chromosomique inductible du gène AmpC: responsable de la résistance à l'amoxicilline, C1G : céfaloquine, C2G : céfoxidine, ceftriaxone, céfotaxime et ertapénème (**McGowan JE, J.r., 2006**)
- ✓ Faible perméabilité membranaire aux β-lactamines, due à la taille insuffisante des porines (**Poole, K., 2004**).

- ✓ Système d'efflux membranaire : la pompe la plus fréquemment rencontrée est de type MexAB-OPrM (**Cattoir, V., 2004**) capable d'exporter les antibiotiques en dehors de la cellule.

1.2.1.4.1.2. Résistance acquise :

1.2.1.4.1.2.1. Résistance non enzymatique :

a) Résistance par mécanisme d'efflux :

De nombreuses pompes d'efflux ont été décrites chez *P. aeruginosa* qui sont désignées d'après leurs composants respectifs avec dans l'ordre : la protéine de fusion membranaire, la pompe et la protéine de membrane externe (MexAB-OprM ; MexCD-OprJ ; MexEF-OprN et MexXY-OprM) (**Poole, K., 2004**), pour MexAB-OprM une augmentation du niveau d'expression de ces protéines peut entraîner une diminution de la sensibilité aux beta-lactamines. Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN ne se manifestent pas normalement, mais suite à des mutations, peuvent être responsables de résistances acquises multiples, dont le spectre est légèrement différent (**Pechère, J.C., et al., 1998**).

b) Modification des PLPs :

La résistance acquise aux β-lactamines par mutation ponctuelle ou disparition d'une PLP, entraînant une diminution d'affinité des β-lactamines pour leurs cibles, reste un phénomène relativement rare chez *P. aeruginosa* bien qu'il ait été décrit pour les PLPs 3 (**Gotoh, N., et al., 1990**) et PLPs 4 chez des patients atteints de mucoviscidose ou de pneumonie (**Godfrey, A. J., et al., 1981, Bellido, F., et al., 1990**).

c) Perte de la porine D2 :

Le principal mécanisme par lequel *P. aeruginosa* acquiert une résistance aux carbapénèmes est la réduction de la perméabilité par perte de la porine OprD anciennement dénommée D2 (**Trias, J., et al., 1989 ; Trias, J., Nikaido, H., 1990b**) qui a été perdue sous l'effet de mutations chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème (**Hancock, R.E., Brinkman, F.S., 2002**). Ce phénomène survient généralement suite à une antibiothérapie incluant l'imipénème (**Quinn, J.P., et al., 1986**). Un déficit en porine D2 associé à une hydrolyse partielle par la céphalosporinase AmpC, se traduit donc par une résistance isolée à l'imipénème (**Livermore, D.M., 1992**).

En comparaison avec l'Imipénème, les autres Carbapénèmes, le Méropénème et le Doripénème, sont moins affectées par la déficience de l'OprD (**Strateva, T., Yordanov, D., 2009, Ocampo-Sosa, A.A., et al., 2012**).

2.1.4.1.2.2. Résistance enzymatique :

a) Résistance par hyperproduction de la céphalosporinase AmpC :

La β -lactamase chromosomique de type AmpC appartenant à la classe C dans la classification d'Ambler a été décrite chez une large variété des bacilles à Gram négatif tel que *P. aeruginosa* (**Parveen, M., et al., 2010**). Des mutations dans le système de régulation de la production entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC. Cette résistance à haut niveau touche l'ensemble des β -lactamines, sauf le céfèpime, le cefpirome et les carbapénèmes (imipénème et méropénème) (**Parveen, M., et al., 2010**)

b) Acquisition de pénicillinases plasmidiques :

P. aeruginosa peut également acquérir différentes β -lactamases grâce à des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons ou intégrons). Trois groupes de β -lactamases responsables de phénotypes de résistance différents ont été identifiés. Il s'agit de carbénicillinases (groupe CARB), d'oxacillinases (OXA) ou de pénicillinases du groupe TEM. Ces pénicillinases à spectre restreint confèrent une résistance à la ticarcilline, la pipéracilline, la cefsulodine mais pas à la ceftazidime ni à l'imipénème (**Cavallo, J.D., et al., 2000a**).

c) Acquisition d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) :

Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés. La première était PER-1 isolée chez un patient originaire de Turquie (**Nordmann, P., et al., 1993**). Entre 1992 et 1998 plusieurs souches productrices de TEM ont été isolées en France:TEM-42, TEM-4, TEM-21 et TEM-24 (**Marchandin H., et al., 2000**), SHV-2a a été détecté en France en 1995(**McMurry, L., et al., 1980**), SHV-5 en Grèce (**Neonakis, I.K., et al., 2003; Poirel, L., et al., 2004**) et VEB-1 en France (**Naas, T., et al., 1999b**).

A la fin du 20e siècle, GES-1 a été rapportée depuis la France (**Dubois, V., et al., 2002b**), le Brésil (**Castanheira, M., et al., 2004**) et l'Espagne (**Viedma, E., et al., 2009**), GES-2 a été rapportée en Afrique du Sud (**Poirel, L., et al., 2001b; Poirel, L., et al., 2002b**). GES-5 a été isolée au Brésil, en Afrique du Sud et en Espagne (**Da Fonseca, E.L., et al., 2007; Labuschagne, C.J., et al., 2008; Viedma, E., et al., 2009**) et plus récemment en Turquie (**Iraz, M., et al., 2014**). GES-9 en France (**Poirel, L., et al., 2005c**). La GES-13 a été rapportée en

Grèce (**Kotsakis, S.D., et al., 2010**) et GES-18 en Belgique (**Bebrone, C., et al., 2013**). Les gènes codant ces enzymes GES sont situés sur des intégrons de classe1 (**Poirel, L., et al., 2002b**).

La BLSE de type IBC-2 (actuellement appelée GES-8) a été rapportée pour la première fois en Grèce (**Mavroidi, A., et al., 2001**). Les BLSEs de type BEL ont été rapportées dans une étude multicentrique entre 2004 et 2008 en Belgique (**Glupczynski, Y., et al., 2010**).

d) Résistance aux carbapénèmes :

La résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème), initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2 (**Philippon, A., Arlet, G., 2006**)

Classe B :

Ce sont des métallo-de β -lactamase (MBL)(VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM). La première carbapénémase identifiée était IMP-1 décrite pour la première fois au Japon en 1991 (**Watanabe, M., et al., 1991**). D'autres variantes de la IMP ont été rapportées à travers le monde (**Strateva, T., and Yordanov, D., 2009**). L'Italie est le premier pays européen à avoir signalé la présence de IMP : l'IMP-2, l'IMP-12 et l'IMP-13 (**Cornaglia, G., et al., 2011**). Plus récemment IMP-18 a été rapportée en France (**Hocquet , D., et al., 2010**) et la première détection d'IMP-15 en Europe a été rapportée dans une étude entre 2009 et 2011 en Espagne (**Gilarranz, R., et al., 2013**) et par la suite au Liban (**Al Bayssari, C., et al., 2014**). Comme pour les BLSE le support génétique de ces enzymes est situé au sein d'intégrons en position plasmidique ou chromosomique. Ces enzymes sont redoutables car elles induisent une résistance de haut niveau à toutes les β -lactamines, à l'exception de l'aztréonam (**Nordmann, P., 2003**).

VIM-1 a été isolé pour la première fois en 1997 en Italie (**Lauretti, L., et al., 1999**). En France, VIM-2 a été isolé pour la première fois en 1996 à Marseille (**Poirel, L., et al., 2000**), l'enzyme VIM-2 est la MBL la plus fréquemment isolée dans le monde chez *P. aeruginosa* (**Corvec, S., 2008**). VIM-4 et VIM-17 en Grèce (**Siarkou, V.I., et al., 2009** ; **Pournaras,, S et al., 2002**), VIM-5 et VIM-38 en Turquie (**Bahar, G., et al., 2004;Iraz, M., et al., 2014**), VIM-13 et VIM-20 en Espagne (**Juan, C., et al., 2008**, **Riera, E., et al., 2011**) ainsi que VIM-14 en Italie (**Mazzariol, A., et al., 2011**).

Une nouvelle MBLs de type FIM-1 a été identifiée en 2007 en Italie (**Pollini, S., et al., 2013**), et NDM-1 a été identifiée pour la première fois en Serbie (**Jovcic, B., et al., 2011**).

Classe D :

Les oxacillinases (OXA-2, 10, 11, 14, 15,16, 19) sont des pénicillinases dont le spectre s'est entendu dans certains cas aux C3G et dans d'autres aux carbapénèmes. A l'exception d'OXA-18, l'activité de ces enzymes n'est pas affectée par les inhibiteurs de β -lactamases. La plupart des oxacillinases à spectre étendu sont codées par des gènes présents sur des plasmides ou des intégrons (Naas, T., Nordmann, P., 1999). La majorité de ces enzymes a été isolée en Turquie (Hall, L.M. et al., 1993; Danel, F., et al., 1995b) et en France (Mugnier, P., et al., 1998a, Poirel, L., et al., 2002a; Hocquet, D., et al., 2010). OXA-18 est codée par le gène chromosomique *bla*_{OXA-18} (Philippon, L.N., et al., 1997) sa séquence en acides aminés n'est pas identique aux autres oxacillinases de classe D. Elle a été décrite pour la première fois en France chez un patient préalablement hospitalisé en Italie (Philippon, L.N., et al., 1997) et par la suite en Tunisie avec une émergence d'OXA-18 entre 1998 et 2000 (Kalai, B.S., et al., 2007). Plus récemment, une nouvelle β -lactamase de Classe D à activité carbapénémase, l'OXA-198, a été rapportée en Belgique (El Garch, F., et al., 2011).

1.2.1.4.2. Mécanismes de résistance aux Aminosides :

La résistance aux aminosides concerne par ordre de fréquence décroissante : la gentamicine, la tobramycine, la nétilmicine, et l'amikacine. La corésistance avec les β -lactamines et les fluoroquinolones est fréquente, surtout pour le sérotype O12. (Poole, K., 2005)

Il existe 2 mécanismes différents de résistance aux aminosides (Bert , F., 2000):

a) Mécanisme enzymatique :

Ce sont les (AAC), (ANT), (APH) (Wright, G.D., 1999) . Les enzymes ANT(2')-I (détermine la résistance à la gentamicine et à la tobramycine), AAC(3)-I (résistance à la gentamicine), AAC(6')-II (résistance à la tobramycine, nétilmicine et gentamicine) et AAC(6')-Ib (résistance à la tobramycine et à l'amikacine) sont les plus répandues chez *P. aeruginosa* (Strateva, T.,Yordanov, D., 2009). le gène *aac(6')-II* était le plus répandu suivi par le gène *ant(2')-I* selon une étude menée dans plusieurs pays européens incluant la France, la Grèce, la Turquie, , et l'Espagne (Miller, G.H., et al., 1997).

En Algérie, les gènes *aac(3')-II*, *aadA1* et *aadA13* ont été identifiés par Sefraoui et al. en 2013, associés au gène *bla*_{VIM-2} (Sefraoui, I., et al., 2014). Les gènes *aadB* et *aacA4* ont été identifiés par Touati et al. en 2013 chez des *P. aeruginosa* productrices de VIM-2 (Touati, M., et al., 2013).

b) Mécanisme non enzymatique :

Modification de la perméabilité membranaire : ce phénomène a été détecté chez des patients atteints de mucoviscidose (**Poole, K., 2005**). La perturbation de transport actif de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie, se traduisant par une résistance de bas niveau à l'ensemble des aminosides. Plus récemment, un système d'efflux actif désigné MexXY, affectant les aminosides et d'autres familles d'antibiotiques (**Ramos, A., et al., 1999**).

La méthylation de l'ARNr capable de modifier la structure ribosomale sur laquelle se fixe, l'ARN 16S. Le gène RmtA a été décrit chez *P. aeruginosa* au Japon en 2003 (**Yokoyama, K., et al., 2003**, **Yamane, K., et al., 2004**) et RmtD a été identifiée au Brésil en 2005 associée à la production de SPM-1 (**Doi, Y., et al., 2007**).

1.2.1.4.3. Mécanismes de résistance aux Quinolones :

Elle est en progression actuellement, et peut survenir selon 3 mécanismes :

- ✓ Modification d'affinité de la cible : les quinolones agissent en inhibant des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN bactérien, l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV. Certaines mutations pouvant survenir au niveau des protéines gyrA et gyrB (sous unités A et B de l'ADN gyrase) ou de la sous unité parC de la topo-isomérase entraînent une baisse de l'affinité pour l'antibiotique.
- ✓ Diminution de la pénétration de l'antibiotique, à la suite de modifications au niveau des porines ou du polysaccharide.
- ✓ La surproduction des pompes d'efflux MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN est à l'origine d'une résistance modérée aux fluoroquinolones (**Wang, D., et al., 2007**). Un nouveau membre de la famille des pompes à efflux tripartite, MexV (protéine de fusion de membrane)-MexW (de type RND protéine membranaire)-OprM, qui confère une résistance aux fluoroquinolones, a été décrit chez *P. aeruginosa* en 2003 (**Li, Y., et al., 2003**).

1.2.1.5. Épidémiologie :

Grâce à l'apport des techniques de biologie moléculaire, les études épidémiologiques ont permis de montrer que les infections dues à *P. aeruginosa* sont endémo-épidémiques avec une part de

transmission croisée non négligeable pouvant atteindre 50% des cas. Néanmoins l'acquisition de cette bactérie est majoritairement endogène, tant en réanimation qu'en milieu de soins.

Pour cela, nous avons fait des recherches dans plusieurs pays du monde sur plusieurs périodes afin de connaitre l'émergence de l'épidémie de cette bactérie .

1.2.1.5.1. A l'échelle mondiale :

- **France :**

Une étude d'incidence de *P. aeruginosa* a été menée en 1996 par 25 centres hospitaliers (13913 lits) de la région Nord-Pas-de-Calais, France. L'enquête s'est déroulée sur deux périodes trimestrielles durant lesquelles ces établissements ont réalisé 230 018 entrées. L'incidence des patients infectés ou colonisés par *P. aeruginosa* établit à 9,4/1 000 admissions et rapportée à l'année à 31,2/100 lits. Les incidences d'isolement calculées par discipline montrent des taux élevés pour les services de réanimation : 425,8 *P. aeruginosa* par an et pour 100 lits.. Cette enquête confirme l'importance de *P. aeruginosa* dans les hôpitaux de la région Nord-Pas-de-Calais (**Cattoen, C., 1999**)

Bertrand *et al.*, Au cours de leur étude pendant 2 ans (1er janvier 1998 au 31 décembre 1999) dans les 2 services de réanimation adultes du CHU de Besançon, 314 patients ont présenté au moins un prélèvement positif à *P. aeruginosa* soit une incidence moyenne de 19,1 patients pour 100 patients hospitalisés. Parmi eux, 166 ont été identifiés par un prélèvement clinique et 148 patients par le dépistage. Soixante dix-sept étaient colonisés à l'admission en réanimation et 237 patients, admis négatifs à l'admission, devenaient positifs au cours de leur séjour. Parmi les cas acquis dans le service, la durée moyenne d'hospitalisation avant qu'un prélèvement se révèle positif était de 15,7 j. Le taux de transmission croisée était globalement de 53,5 %, respectivement de 48,1 % dans le service de réanimation médicale et 59,2 % dans le service de réanimation chirurgicale. (**Bertrand, X., et al., 2003**).

Récemment, Dans la dernière enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales menée en France , *P. aeruginosa* représentait 10,9% des espèces responsables d'infections (à la troisième place après *E.coli* et *Staphylococcus aureus*). (**Elmeskini, K., 2011**)

- **Etats-Unis :**

Dans l'étude du NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) réalisée entre 1998 et 2003, la médiane des taux de résistance à la pipéracilline était de 14,3% des souches isolées dans les services de soins intensifs et de 9,2% des souches isolées des autres services. Les médianes des taux de résistance à la ceftazidime étaient dans ces mêmes services respectivement de 10,8% et 7%, celles de l'imipénème de 13,2 % et 10% et celles de la ciprofloxacine de 29,3% et 27,4%. On note surtout une progression importante de la résistance entre les périodes 1998-2002 et l'année 2003 : cette augmentation est de 20% pour la résistance à la ceftazidime, de 15% pour la résistance à l'imipénème, et de 9% pour la résistance à la ciprofloxacine. (**Minchella, A., 2010**).

- **Brésil :**

le rôle de *P. aeruginosa* comme un important pathogène chez les enfants, spécialement chez les nouveau-nés prématurés est bien connu depuis 1960. Plusieurs sites de colonisation par cette bactérie sont identifiés, mais le tractus respiratoire et gastro-intestinal sont les plus fréquents, ces sites pourraient par conséquent être à l'origine de plusieurs infections. Les syndromes cliniques qui sont décrits chez des nouveau-nés infectés comprennent la conjonctivite, énophthalmie, bactériémie, méningite, diarrhée et endocardite nécrosant (**Brito, D.V.D., et al., 2003**).

- **Tunisie :**

Boutiba-Ben Boubaker et al., Durant une période de 5 semaines (du 25 septembre 1999 au 30 octobre 1999) une épidémique d'infections urinaires à *P.aeruginosa* multirésistante aux antibiotiques notamment à l'imipénème s'est déclarée à l'unité de réanimation chirurgicale du service d'urologie de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis, posant de sérieux problèmes thérapeutiques. Une enquête épidémiologique a révélé la présence de la souche épidémique dans plusieurs endroits de cette unité. Le génotypage a révélé l'existence de 2 clones différents, chacun ayant été retrouvé au moins une fois dans l'environnement. Ainsi, le milieu hospitalier constitue une source majeure de contamination par *P. aeruginosa* d'où la nécessité d'une surveillance régulière pour la mise en place des mesures de prévention nécessaires. (**Boutiba-Ben Boubaker, I., et al., 2003**).

Achour et al., en 2006 ont rapportés une épidémie d'infection respiratoire à *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème dans un service de réanimation néonatale du centre de maternité et de néonatalogie de la Rabta de Tunisie (**Achour, W., et al., 2006**).

- **Maroc :**

Chinbo, et al., selon leur étude descriptive qui a été menée sur une période de 4 ans (entre Janvier 2010 et Décembre 2013) au niveau du Pole Mère- Enfant du CHU de Marrakech (Maroc). 168 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées. Les infections à *P. aeruginosa* surviennent principalement sur un terrain d'immuno dépression. Les sites d'isolement étaient dominés par les pus (29,7%), suivis des bactériémies (20,8%). Les souches multi résistantes ont représenté 25,6% de l'ensemble des isolats. Les taux de multi résistance les plus élevés ont concerné les services de réanimation pédiatrique et néonatale (66,1%) (**Chinbo, M., et al., 2014**).

- **Libye :**

Un total de 49 souches cliniques non répliquée ont été recueillies pendant 12 mois entre Avril 2013 et Avril 2014 dans deux hôpitaux (Burn et chirurgie plastique Hôpital [BPSH] et Benghazi Médical Center [BMC]) dans deux villes différentes en Libye (Tripoli et Benghazi) , un total de 24 *P. aeruginosa* ont été isolées à partir de différents spécimens pathologiques, y compris les blessures (47,8%), l'aspiration trachéale (25,1%) et des voies urinaires (15,9%), récupéré des patients hospitalisés dans divers unités hospitalières, y compris les soins intensifs (44,9%), les traumatismes (20,4%), la chirurgie (14,4%), la cardiologie (7,8%), la pédiatrie (7%) et la médecine interne (5,5%). Dont (87,75%) des souches sont résistant à l'imipénème. Le PCR a révélé la présence de gène *blaVIM-2* dans tous les *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème (**Mathlouthi, N., et al., 2015**).

1.2.1.5.2. A l'échelle nationale :

Une étude rétrospective préliminaire porte sur la période de juin 2003 à décembre 2005. Elle intéresse l'ensemble des prélèvements bactériologiques ayant pu être réalisés au centre des brûlés d'Annaba. L'effectif est de 633 micro-organismes isolés dont 128 *Pseudomonas* (20,2%): 127 *aeruginosa* (99,2%), 1 *fluorescens* (0,8%); distribution selon le site de prélèvement: écouvillon (87,5%), prélèvement trachéobronchique (4,6%), hémoculture (3,1%), cathéters (1,6%), urine (1,6%) et sonde urinaire (1,6%). Le pyocyanique se situe après le staphylocoque

pour les prélèvements précoces et repasse en tête après un séjour supérieur à une semaine, où 89% des pyocyaniques sont identifiés. Il est en 1^{ère} position dans les pneumopathies sous ventilation assistée invasive. Il se classe 3^{ème} dans les hémocultures et les cultures de cathéters. Dans les infections urinaires il est devancé par *Candida* et la flore périnéale (**Chaibdraa, A., et al., 2008**). Dans le même centre une étude réalisé pendant la période de 2014 et 2015, montre que la fréquence de prélèvements de pus par rapport aux autres produits pathologiques est dominante avec une fréquence de 78%.(**Meradji, S., et al., 2016**).

Drissi Mourad, pendant la période d'étude (Novembre 2005 – Juin 2007), 255 souches consécutives de *P. aeruginosa* ont été isolées à partir de 596 prélèvements cliniquement significatifs soit 42,8%, la plupart des souches montre des hauts niveaux de résistance aux antibiotiques en particulier dans les services de soins intensifs et confirme l'importance des *P.aeruginosa* à l'hôpital de Tlemcen (**Drissi, M., 2007**).

Sur une période d'étude de quatre ans, allant de janvier 2009 à novembre 2012, 217 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées à partir de 900 prélèvements réalisés au niveau de trois centres hospitalo-universitaires (CHU) du nord-ouest algérien (79 CHU d'Oran, 66 du CHU de Tlemcen et 72 du CHU de Sidi Bel Abbes à partir des services de réanimation (65,90%), services de chirurgie (15,21%), services de neurochirurgie (7,83%), services de traumatologie (5,07%), d'urgences (3,69%), et de médecine interne (2,30%), ce résultat montre l'importance des *P.aeruginosa* dans les hôpitaux du nord-ouest algérien (**Sefraoui, I., 2015**).

Touati, durant son étude de Novembre 2010 à Septembre 2011 dans le service de réanimation du CHU Annaba-Algérie qui reçoit des malades portant des tares et même des polytraumatisés de cinq wilayas (Guelma, Taref, Skikda, Souk Ahras, Tebessa) du Nord Est Algérien, un total de 300 hospitalisations a été enregistré au niveau de ces services. Au cours de cette période, 64 épisodes infectieux à bacilles à Gram négatif non fermentants ont été confirmés, dont 34 sont révélées à *Pseudomonas aeruginosa*. (**Touati, M., 2013**).

1.2.2. *Acinetobacter baumannii* :

1.2.2.1. Historique et taxonomie :

L'histoire du genre *Acinetobacter* a commencé en **1911**, lorsque le microbiologiste **Néerlandais Beijerinck** a isolé un organisme nommé *Micrococcus calcoaceticus* qui a été isolé du sol par enrichissement dans un milieu minimal contenant du calcium- acétate (**Beijerinck, N., 1911**). En **1954**, **Brisou et Prévot** proposent le genre *Acinetobacter* pour des *achromobactéries* de la tribu

des *Achromobactereae* immobiles, parfois capsulées, aérobies ou aéro-anaérobies, cultivant facilement sur les milieux ordinaires et donnant fréquemment des formes courtes et coccoïdes.

En **1961**, dans son traité de systématique bactérienne **Prévot** décrit 18 espèces. En **1968**, une étude de taxonomie numérique réalisée par **Baumann et al.**, montre que les souches oxydase négative constituent un genre unique et ces auteurs restreignent le genre *Acinetobacter* aux seules souches oxydase négative (**Euzéby, J.P., 2003**).

Dans l'édition de **1974** du **Bergey's Manuel of Systematic**, le genre *Acinetobacter* a été répertorié, avec la description d'une seule espèce, *Acinetobacter calcoaceticus*. En revanche, dans « Approved List of Bacterial Names », deux espèces différentes, *A. calcoaceticus* et *A. lwoffii*, ont été incluses, basé sur le fait que certains *Acinetobacter* peuvent acidifier le glucose tandis que d'autres non (**Bakour, S., 2014**)

Une avance majeure dans l'histoire du genre *Acinetobacter* a été réalisée en **1986** grâce aux techniques d'hybridation ADN/ADN de **Bouvet et Grimont** qui est parvenue à distinguer 12 espèces génomiques, certaines étant clairement dénommées comme *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii* et *Acinetobacter lwoffii* (**Dortet, L., et al., 2006**). Actuellement, le genre *Acinetobacter* comprend 34 espèces ; *A. baumannii* est l'espèce la plus souvent isolée en milieu hospitalier (**Kim, U.J., et al., 2014**). Ce genre est défini comme appartenant à l'embranchement de *Proteobacteria* au sein de la classe des *Gamma Proteobacteria*, à l'ordre de *Pseudomonadales* et à la famille des *Moraxellaceae* (**Kim, U.J., et al., 2014**).

1.2.2.2. Habitat :

A. baumannii est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans le sol, l'eau potable, les eaux de surface ainsi que dans diverses denrées alimentaires. (**Siegrist, H.S., 2000**).

Chez l'homme et les animaux, *A. baumannii* fait partie de la flore cutanée normale. Ces bactéries sont isolées de la bouche, de la gorge, de la trachée, du nez, et de la conjonctive. (**Lambert, T., 2007**). Selon une étude récente, *A. baumannii* a été isolé dans plusieurs sources, comme la nourriture, par conséquent, la nourriture de l'hôpital pourrait être une source potentielle d'acquisition d'*A. baumannii* et de colonisation subséquente du tube digestif des patients hospitalisés (**Giamarellou, H., et al., 2008**).

Lors d'épidémies hospitalières, *A. baumannii* est retrouvé dans l'environnement clinique immédiat du malade (appareils de ventilation, lit, matelas, tables...) et dans l'environnement

humide (siphons de lavabo, linge humide...) ainsi que sur les mains des soignants. En effet cette espèce possède une capacité de survie prolongée dans l'environnement, il résiste longtemps dans des conditions environnementales variées et résiste bien à la dessiccation (**Wendt, C., et al., 1997**). La durée moyenne de survie sur une surface sèche a été estimée à un mois (**Jawad A, et al., 1997**). Sa durée de survie sur les mains est supérieure à 60 minutes après inoculation de 104 unités formant colonies (UFC) par doigt (**Pittet, D., et al., 2006**).

1.2.2.3. Caractères bactériologiques :

A l'examen direct, *A. baumannii* se présente comme des bacilles ou des coccobacilles à Gram négatif souvent associés par deux (**Guillou. J., et al., 2002**) . Leur diamètre varie de 0.9 à 1.6 nm et leur longueur de 1.5 à 2.5 μ m. Ils deviennent cocoïdes en phase stationnaire de croissance, immobile et sans flagelles, ils peuvent cependant se déplacer grâce à des structures polaires ressemblant à des fimbriaes de 5 nm de diamètre et de 10 à 15 nm de long (**Fechkeur Y, et al., 1998**). Ils sont non sporulés et en général très polymorphes avec des formes filamentueuses dans les cultures âgées (**Guillou. J., et al., 2002**).

L'identification des diverses espèces est difficile, repose sur la capacité de développement à 37, 41 et 44°C en bouillon trypticase soja après 48 heures d'incubation et l'hydrolyse de la gélatine. Ces procédés ne suffisent pas pour le diagnostic exact de l'espèce (**Denis, F., et al., 2007**). Par contre, *A. baumannii* se caractérise par sa température de croissance entre 15°C et 44°C, critère essentiel dans le diagnostic différentiel avec les autres espèces (**Godineau Gauthey, N., et al., 1988**). L'isolement en milieu solide peut être obtenu après incubation à température comprise entre 30 et 37 °C sur les milieux conventionnels (gélose au sang, gélose chocolat, gélose trypticase soja, etc.) et sur les milieux sélectifs des bacilles à Gram négatif comme la gélose de Mac Conkey ou la gélose de Drigalski (**Denis, F., et al., 2007**).

Ce sont des aérobies stricts, non fermentant, Oxydase négative, Catalase positive, incapable de réduire le nitrate (**Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J., 1996 ; Giamarellou, H., et al., 2008**), Décarboxylation de la lysine et Ornithine négative , arginine dihydrolase négative , gélatinase négative , hémolyse négative , acidification sans production du gaz du glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose et lactose. Une réponse négative est obtenue pour les tests LDC, ODC, ADH, production d'hydrogène sulfuré, indole, bêta-galactosidase et DNase. Une réponse variable est obtenue pour l'hydrolyse de la gélatine. Quelques souches produisent une uréase ou une phénylalanine désaminase d'activité faible (**Avril, J.L., et al., 1992**).

1.2.2.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

Les classes majeurs d'antibiotiques généralement utilisées pour la thérapie hospitalières des infections a *A.baumannii* sont : **les Bêta-lactamines, les Aminosides et les Quinolones**, lors du traitement ces antibiotiques peuvent être utilisés ou en association selon le degré de la résistance présenté.

1.2.2.4.1. Mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines :

1.2.2.4.1.1. Résistance Naturelle :

Les souches d'*A. baumannii* sont naturellement résistantes à la pénicilline G, à l'amoxicilline et aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération. Les souches sauvages produisent une β -lactamase de type céphalosporinase (ou AmpC), désignée « *Acinetobacter*-derived cephalosporinases » (ADCs). La présence de ces enzymes ADCs représente le mécanisme de résistance aux β -lactamines le plus fréquent chez *A. baumannii*. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les aminopénicillines et les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération.

A. baumannii possède aussi naturellement sur son chromosome un gène codant pour une oxacillinase (β -lactamase de classe D) dont le représentant principal est OXA-51, avec de très nombreuses variantes : OXA-69, OXA-66 par exemple. Le rôle des gènes de type *blaOXA-51* dans la résistance semble très faible . La résistance naturelle d'*A. baumannii* à certaines β -lactamines résulte de l'association de plusieurs mécanismes incluant la taille réduite des protéines de membrane externe et la production limitée des porines.(**Touati, M., 2013**)

1.2.2.4.1.2. Résistance acquise :

1.2.2.4.1.2.1. Résistance non enzymatique :

a) Modification des PLPs :

Sept PLP ont à ce jour été identifiées dans l'espèce *A. baumannii* : PLP1a, PLP1b, PLP2,PLP3, PLP5/6PLP6b, et PLP7/8, la PLP6b a été en cause dans une souches présentant une résistance aux carbapénèmes (**Decré, D., 2012**).

b) Diminution de la perméabilité :

A.baumannii possède un petit nombre de porine ce qui la rend beaucoup moins perméable que les autres bactéries Gram négatif et qui pourrait être une raison pour la résistance intrinséque attribuable à *A.baumannii* (**Camp C., Owatha, I.T., 2010**). Ainsi, le rôle de la perte ou de la modification de ces porines, liée à l'inactivation d'un gène codant pour une porine nommée

CarO et la perte de la protéine 33-36KDa, la protéine de 29KDa(CarO) et une protéine de 43 KDa (**Gordon, N.C., Wareham, D.W., 2010 ; Grail, N., et al., 2011**).

c) Excrétion de l'antibiotique : (Efflux)

Parmi les systèmes d'efflux décrit chez *A.baumannii* : AdeBC et AdeIJK, appartenant à la famille RND conférant une résistance à un large spectre d'agents antimicrobiens y compris les bêta-lactamines, la pompe AdeABC est retrouvée chez 80% des souches d'*A.baumannii*.

1.2.2.4.1.2.2. Résistance enzymatique :

a) Pénicillinases :

La description de la résistance acquise aux pénicillines a été rapportée dès la début des années 1980 avec l'identification de la pénicillinase TEM-1 puis du variant TEM-2. Ensuite la pénicillinase CARB-5 et SCO-1 ont été caractérisées (**Poirel, L., Nordman, P., 2006**), ces enzymes confèrent la résistance aux pénicilline à large spectre (ticarcilline, pipéracilline) et sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Une oxacillinase à spectre étroit (OXA-21), portée par un intégron et conférant un phénotype de pénicillinase a été décrite en 1997 (**Decré, D., 2012**).

b) Hyperproduction de céphalosporinase :

La résistance aux céphalosporines à spectre étendu est intrinsèquement liée à la présence d'un élément en amont du codon d'initiation du gène *bla_{ampC}* est connu sous le nom *ISAbal*, ce qui détermine la régulation du gène en entraînant une surexpression de céphalosporinase AmpC. *ISAbal* apporte des séquences reconnues promotrices qui permettent donc d'elever très significativement le niveau de production de l'enzyme ce qui se répercute sur le phénotype de résistance par une élévation importante des CMIs des bêta-lactamines appartenant au spectre de substrat de cette enzyme. (**Poirel, L., Nordman, P., 2006 ; Howard, A., et al., 2012**).

c) β -lactamase à spectre étendu (BLSE) :

Les BLSE de classe A du schéma du Ambler ont également été décrites chez *A.baumannii*, Le gène codant pour l'enzyme PER-1 a été trouvé dans de nombreux isolats aux Etats-Unis, en Corée et la Turquie (**Poirel, L., et al., 2005a ; Hujer, K.M., et al., 2006 ; Kim, J.W., et al., 2008**), PER-2 en Argentine et un nombre important des isolats de la Belgique et la France codent le gène de la VEB-1 (**Naas, T., et al., 2006a**). Par la suite, d'autres BLSE comme TEM-92 , TEM-116 , CTX-M-2 ont été identifiés au Japon, qui est un pays où le premier type de CTX M

enzyme a été identifié il y a plus de 15 ans (**Nagano, N., et al., 2004**) ,ensuite CTX-M-43, SHV-12 et SHV-5 en chine (**Poirel, L., Nordman, P., 2006 ; Pelege, A.Y., et al., 2008 ;Cattoir, V., 2008**). Plus récemment CTX-M-15 ont été retrouvées ponctuellement ou ont été responsables de bouffées épidémiques (**Decré, D., 2012**).

d) Résistances aux carbapénèmes :

Classe A :

Les carbapénèmases de classe A sont essentiellement détectées chez les entérobactéries, mais elles ont été également identifiées chez *A. baumannii* : GES-11 (**Moubareck, C., et al., 2009**), GES-14, KPC-2, KPC-3, KPC-4, et KPC-10 (**Zarrilli, R., et al., 2013 ; Tang, S.S., et al., 2014**), et récemment GES-22 en Turquie (**Cicek, A.C., et al., 2014**) .

Classe B :

Les enzymes MBLs les plus décrites chez *A. baumannii* sont les variants de type IMP, VIM, SIM, et NDM (**Zarrilli, R., et al., 2013**), ces enzymes confèrent un niveau élevé de résistance aux carbapénèmes, avec des CMI supérieures à 32 mg/l (pour l'imipénème) dans la plupart des cas . La première variante détectée chez *A. baumannii* était IMP-2 signalée en 2000 en Italie, suivi de l'IMP-4 détectée une année plus tard à Hong Kong (**Zarrilli, R., et al., 2013**). L'enzyme NDM, d'abord trouvé dans *K. pneumoniae* est maintenant répandue dans *A. baumannii* en Inde (**Yong, D., et al., 2009; Karthikeyan, K., et al., 2010**), puis elle a été retrouvée en Allemagne, Belgique, Bangladesh, Chine et en République tchèque . À ce jour, 33 variantes de IMP, 33 variantes de VIM et 6 variantes de NDM ont été rapportées

Classe D :

Les oxacillinases en général hydrolysent l'amoxicilline, la méthicilline, céphaloridine et dans une certaine mesure, céfalotine , n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G mais l'évolution par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre a du avoir lieu comme pour les dérives de TEM/SHV . Elles hydrolysent habituellement l'oxacilline plus efficacement que benzylpénicilline (**Girlich, D., et al., 2004 ; Poirel, L., Nordman, P., 2008**), elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique . Actuellement, plus de 232 variantes de l'oxacillinases ont été identifiées au niveau de la protéine . Des oxacillinases aux propriétés de carbapénèmases sont identifiées chez *A. baumannii*, ces oxacillinases sont de trois grands types : OXA-23, OXA-24/OXA-40 et OXA-58. Elles confèrent des degrés variables d'hydrolyse des Carbapénèmes dépendant de leur niveau d'expression (**Heritier, C., 2005**).

OXA-23, initialement nommée ARI-1 pour "Acinetobacter résistant à l'imipénème" a été identifié en Ecosse en 1985 (**Paton, R., et al., 1993**). Le OXA-23-like enzyme OXA-27, isolé de Singapour, partage 99% d'identité avec OXA-23 .Une autre variante, OXA-49, a été isolée en Chine (**Brown, S., et al., 2005**). Oxa-23 enzymes ont été identifiées dans *A. baumannii* dans diverses parties du monde : Brésil (**Dalla-Costa, L., et al., 2003**), la Chine (**Yu, Y.S., et al., 2004**), Londres (**Coelho, J.M., et al., 2006**) et Singapour (**Koh, T.H., et al., 2007**). Ils peuvent être présents à la fois sur le plasmide et le chromosome (**Paton, R., et al., 1993; Bonnet, R., et al., 2002**). D'autres variantes de OXA-23 enzymes sont OXA-27, OXA-102, OXA-103, OXA-105, et OXA-133 ont été identifiées .

OXA-24, il est moins fréquent que OXA-23 il a été identifié dans plusieurs régions en Europe (**Qi C., et al., 2008**) et en Algérie (**Bakour S., et al., 2012**). OXA-58, ce gène a été initialement localisé sur un plasmide chez *A. baumannii* . Depuis, il a été identifié dans le monde entier : Europe (**Pechere J.C., et al., 1999**), Argentine (**Merkier, AK., et al., 2008**) , Australie (**Peleg A.Y., et al., 2008**) et Etats-Unis (**Castanheira M., et al., 2008**), et en Afrique du nord comme l'Algérie (**Drissi M., et al., 2010**) et la Tunisie (**Poirel, L., et al., 2008**). OXA-143 a été identifiée au Brésil (**Higgins, P.G., et al., 2009**) .

1.2.2.4.2. Mécanismes de résistance aux Aminosides :

La modification enzymatique compte pour la majorité des mécanismes de résistance pour les aminosides dans les différentes espèces d'*Acinetobacter baumannii* y compris:

l'Phosphotransferases APH (3') - Ia, APH (3') - VIa, APH (3') - II, l'Acétyltransférases AAC (3) -Ia, AAC (3) -IIa, AAC (6') - Ib, AAC (6') - Iad, AAC (6') - Im, et AAC (6') – II et la Nucléotidyltransférase ANT (2") - Ia, ANT (3") - Ia, et ANT (3") (**Nemec, A., et al., 2004** ; **Cho, Y.J., et al., 2009** ; **Boo, T.W., et al., 2009** ; **Huang, L.Y., et al., 2010**).

L'un des mécanismes les plus importants de la résistance à l'aminoside est la post-transcriptionnel ARNr méthylation par methylases ARNr 16S. ARNr 16S méthylation par le gène armA a été décrit pour les souches *A. baumannii* en provenance du Japon, de Corée et d'Amérique du Nord (**Yamane, K., et al., 2005**; **Lee, H., et al., 2006a**; **Doi, Y., et al., 2007**) .

La coexistence de armA avec deux gènes de résistance aux carbapénèmes, *bla*_{OXA-23} et *bla*_{NDM-1}, a été récemment rapporté en Inde (**Karthikeyan, K., et al., 2010**). Plusieurs pompes d'effleux peuvent être impliquées , les plus importantes : la famille RND (AdeABC) et MATE (polychimiothérapie et toxiques composé extrusion) famille (Abem) (**Vila, J., et al., 2007**; **Vila, J., Martinez, J.L., 2008**).

1.2.2.4.3. Mécanismes de résistance aux Quinolones :

la résistance aux Quinolones chez *A. baumannii* est principalement due à des mutations chromosomiques dans la région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) de la *gyrA* et *parC* gènes avec la production subséquente de l'ADN gyrase bactérienne et l'enzymes topoisomérase IV (**Jain, R., Danziger, L.H., 2004**). Ser-83 et Ser-80 en *GyrA* et *ParC*, respectivement, sont les résidus des acides aminés les plus fréquemment mutés dans les quinolone (**Vila, J., et al., 1995** ; **Vila, J., et al., 1997**). Toutefois, la résistance aux quinolones pourrait également être due à une diminution de l'efflux et / ou augmentation de l'efflux de quinolones (**Jain, R., Danziger, L.H., 2004**). Il faut noter que les gènes de résistance aux quinolones à médiation plasmidique, comprenant *aac* (6') - *Ib-cr* et *qnr*, ont été jusqu'ici non identifiés dans *Acinetobacter* (**Adams-Haduch, J.M., et al., 2008**).

1.2.2.5. Epidémiologie :

A. baumannii est une bactérie aérobie stricte souvent responsable d'épidémies d'infections nosocomiales dans les services de soins intensifs et dans la réanimation . La survenue d'épidémie est favorisée par sa tolérance à la dessiccation et son antibiorésistance naturelle contribuant au maintien de cette bactérie dans l'environnement hospitalier. Une meilleure connaissance de l'épidémiologie des infections à *A. baumannii* aux antibiotiques est nécessaire afin de développer des stratégies destinées à limiter leur dissémination . Pour cela, dans cette partie nous avons fait plusieurs recherches dans différents pays du monde sur plusieurs périodes.

1.2.2.5.1. A l'échelle mondiale :

- France :**

En France, une épidémie d'*A. baumannii* a large diffusion a été décrite dans la région Nord-Pas-de-Calais d'avril 2003 à mai 2004. Devant l'ampleur de cette épidémie, en septembre 2003, un réseau d'alerte coordonné par le Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales (CCLIN – Paris Nord), l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), l'Agence régionale de la santé (ARS) et un laboratoire expert (CHU Bicêtre) ont diffuse des recommandations (**Naas, T., et al., 2006a**) . De Mars 2010 à Juin 2011, une autre épidémie d'infections à *A. baumannii* a touché neuf établissements de santé de cette même région du Nord de la France. L'infection la plus fréquente est la pneumopathie acquise sous ventilation. Suivent les bactériémies, les infections des tissus mous, les infections urinaires essentiellement sur sonde et les méningites post-chirurgicales. Chez les patients de réanimation, le taux de mortalité dans les bactériémies à

A. baumannii varie entre 17 et 46 % et peut s'élever jusqu'à 70 %, selon les études, dans les pneumopathies acquises sous ventilation (**Naas, T., et al., 2008**)

- **Etat Unis :**

Wroblewska, et al. en 2004 ont décrit une épidémie de méningite nosocomiale développée en post-opératoire due à *A. baumannii* chez 7 patients de neurochirurgie. Les échantillons d'*A. baumannii* ont été typés par profil biochimique et antibiogramme et par PCR. La souche impliquée était multi-résistante, cependant une sensibilité à l'imipénème et à netilmicine a été observée. Une recherche de l'origine environnementale de la souche épidémique a été réalisée. Deux des échantillons provenant de l'environnement hospitalier correspondaient à *A. baumannii* de l'épidémie, l'une étant cultivée à partir du matériel d'aspiration utilisé pour les soins. Trois patients sont décédés. L'introduction d'*A. baumannii* épidémique multirésistant dans une unité de neurochirurgie est un facteur de risque important pour les patients bénéficiant d'interventions de neurochirurgie. (**Wroblewska, M.M., et al., 2004**).

Une étude rétrospective de cohorte avec appariement, a été conduite dans deux hôpitaux de Baltimore (Etats-Unis) afin d'étudier l'évolution des patients présentant une infection à *Acinetobacter* multirésistant aux antibiotiques et de la comparer à celle des patients présentant des infections à *Acinetobacter* sensible aux antibiotiques et à celle des patients sans infection à *Acinetobacter*. Une analyse multivariée contrôlant la sévérité de la maladie et les maladies sous-jacentes a identifié une association indépendante entre les patients présentant une infection à *Acinetobacter* multirésistant aux antibiotiques (n=96) et une augmentation de la durée des séjours hospitaliers et en soins intensifs comparée à celles de 91 patients présentant une infection à *Acinetobacter* sensible et de 89 patients non infectés. Ces résultats soulignent la nécessité de stratégies de lutte contre le risque infectieux destinées à prévenir la transmission croisée dans les établissements de santé. (**Sunenshine, R.H., et al., 2007**).

- **Espagne :**

Les facteurs de risque potentiels d'acquisition d'*A. baumannii* résistant à l'imipénème ont été examinés dans une étude de cohorte conduite dans 25 centres hospitaliers d'Espagne en novembre 2000. Au total *A. baumannii* a été isolé chez 203 patients, des isolats résistant à l'imipénème étant issus de 88 patients (43 %) et des isolats sensibles à l'imipénème provenant de 115 patients (57 %). Une large distribution clonale est observée parmi les isolats résistantes à

l'imipénème. Les résultats montrent que *A. baumannii* résistant à l'imipénème est un pathogène nosocomial largement répandu en Espagne et qu'il atteint une fréquence anormale dans plusieurs centres hospitaliers. Les facteurs de risque indépendants d'acquisition d'*A. baumannii* sont la taille de l'hôpital supérieurs à 500 lits, un traitement antibiotique antérieur, un cathéter urinaire, une intervention chirurgicale. (**Cisneros, J.M., et al., 2005**).

- **Australie :**

En 2007, une étude rétrospective était pour décrire les changements de la sensibilité aux antibiotiques d'*A. baumannii* dans 3 hôpitaux de Melbourne. Elle a consisté en une revue sur 5 ans des données microbiologiques. Le taux de nouveaux isolats d'*A. baumannii* pour 10 000 hospitalisations par hôpital était calculé. Les autres informations collectées incluaient le profil de résistance aux antibiotiques, l'âge, le sexe, la durée d'hospitalisation et le type de service (unité de soins intensifs ou non). Le taux a considérablement augmenté pour 2 hôpitaux mais pas pour le 3ème. Dans un hôpital, ce taux croissant était associé à l'antibiorésistance. La plupart des isolats étaient identifiés chez des patients hospitalisés en unité de soins intensifs. Bien qu'une proportion significative d'isolats provienne d'hémoculture, beaucoup étaient issus de prélèvements respiratoires. Cette étude documente l'établissement d'*A. baumannii* comme un pathogène nosocomial dans 2 hôpitaux de Melbourne et sert d'alerte pour le futur (**Marshall, C., et al., 2007**)

- **Maroc :**

Une étude rétrospective réalisée durant la période du (30 Juin 2000 / 30 Juin 2001) à l'hôpital Mohammed V à Rabat, 147 souches d'*A.baumannii* ont été isolées. Plus des 2/3 des isolats (67%) provenaient du service de réanimation. (**Elouannass, M., et al., 2003**). Entre Janvier 2013 et Septembre 2014 une étude rétrospective, descriptive, comparative et analytique menée au service de réanimation polyvalente A1 du CHU Hassan II de Fès-Maroc. Ce travail inclut les patients admis au service de réanimation en post-opératoire d'une neurochirurgie durant cette période d'étude et présentant une évolution marquée par la survenue d'une méningite post opératoire , 10 patients ont été recensés, admis au service , présentant une méningite nosocomiale à *A. baumannii* et répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion. (**Channouf, A., 2016**).

• Tunisie :

Il s'agit d'une étude rétrospective effectuée dans une unité de réanimation médicochirurgicale tunisienne de 18 lits, s'étendant sur une période d'une année du 1^{er} Janvier 2012 jusqu'au 31 Décembre 2012. Dans cette période *A. baumannii* était l'espèce la plus isolée, avec 93 souches sur 431 correspondant à un taux de 21,6 % de toutes les souches bactériologiques. 70 souches étaient en rapport avec une infection sur un total de 326 correspondants à un taux de 21,5 %, recensés chez 43 patients. La mortalité était de 58,1 % ($n = 25$). (**Trabelsi, B., et al., 2014**)

• Borkina faso :

Une étude prospective conduite au Centre municipal de santé bucco-dentaire de Ouagadougou de Burkina Faso, du Juin 2014 jusqu' à Octobre 2014. Une prédominance de la tranche d'âge 19-40 ans (55,2 %) sur les 125 patients reçus a été observée. Trois souches d'*A. baumannii* (2,4 %) ont été isolées des cellulites chroniques et identifiées. Elles étaient totorésistantes aux 21 antibiotiques testés et produisaient de BLSE (**Wendpoulomdé, A.D., et al., 2016**)

1.2.2.5.2. A l'échelle nationale :

Une étude prospective a été réalisée par Touati , sur la caractérisation de l'antibiorésistance des souches d'*A. baumannii* et *P. aeruginosa* rendus responsables d'infection chez des patients hospitalisés au service de réanimation CHU- Annaba, sur une période de onze mois (Novembre 2010 à Septembre 2011). Au courant de cette période, un total de 64 bacilles à Gram négatif (30 *A. baumannii* et 34 *P. aeruginosa*) a été isolé , *A. baumannii* a été isolé à partir de divers prélèvements, surtout des aspirations trachéales qui représentent 63.33%. Par ailleurs, 20% à partir de pus divers où l'infection était polymicrobienne, 10% des urines de patients sondés. Parmi les *A. baumannii*, 22 possèdent une carbapénémase de type oxacillinase. Ces résultats soulignent la diffusion des carbapénémase de type oxacillinase chez *A. baumannii* dans ce service , ce qui incite la mise en œuvre de politique de surveillance de la résistance aux antibiotiques (**Touati, M., 2013**).

L'étude de Ramoul a été réalisée sur une période de deux ans entre Janvier 2010 et Octobre 2011, un total de 95 bacille à Gram négatif (91,57%) a été identifié dont 23 sont *A. baumannii*, ont été recueillis au niveau du laboratoire central de microbiologie de CHU Dr Dorban Annaba. L'antibiogramme d'*A. baumannii*, montre des niveaux de résistances très élevées aux antibiotiques testés, particulièrement aux β -lactamines de groupes céphépemes (Cefepime

100%), pénames, monobactames et une résistance aux carbapénèmes de 91,30% et aux quinolones (86,95%). La résistance d'*A. baumannii* aux carbapénèmes est liée à la sécrétion de plusieurs carbapénemases essentiellement OXA-23, ce résultat confirme l'importance des oxacillinase dans les hôpitaux d'Annaba (**Ramoul, A., 2013**).

Sur une période de Avril à Juillet 2011, 153 prélèvements ont été réalisés dont 91 au niveau du service de réanimation, 24 au niveau du service de chirurgie, 13 du service de neurochirurgie et 25 au niveau du service de l'O.R.L (Oto-rhino-laryngologie) au niveau de CHU de Tlemcen. L'analyse des prélèvements a permis d'isoler 115 bacilles à Gram négatif, dont 33 *A. baumannii* (58,92%) sur un total de 33 souches d'*A. baumannii*, 80% ont présenté une résistance à l'imipénème avec un niveau de CMI de 64 μ g /ml, ce résultat confirme les résultats trouvés dans l'est Algérien sur l'émergence d'*A. baumannii* productrice de carbapénémase et responsable d'épidémie dans certain service. (**Liazip, A., 2011**)

Selon l'étude de Bakour , un total de 130 souches d'*A. baumannii* a été collecté au cours d'une période de 4 ans (Mars 2010 à Mars 2014) dans 5 hôpitaux. Le résultat montre que la majorité des souches testées sont résistantes presque à tous les antibiotiques testés(Carbapénèmes, Aminosides, et les Quinolones) (**Bakour, S., 2014**).



Partie II

Matériel et méthodes

Nous avons mené une étude pratique sur l'identification et l'évaluation de l'antibiorésistance des bacilles à Gram négatif (BGN) durant la période allant du mois de Mars 2013 jusqu' au mois de Mars 2015. Au cours de cette période, un total de 186 souches non dupliquées d'origine pathologique a été collecté à partir de différents établissements de santé :

Etablissement public hospitalier de Guelma -Ibn Zohr-, établissement public hospitalier de Skikda -Abderrezak Bouhara- , établissement public hospitalier de Annaba et CHU Iben Sina.

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies: la date , le type du prélèvement, l'âge et le sexe du patient ainsi que le service.

La 1^{ère} étape de notre travail expérimental a été réalisée au sein du laboratoire de Microbiologie du département de biochimie de l'Université Badji Mokhtar Annaba : isolement, identification et étude de la résistance aux antibiotiques.

La 2^{ème} étape a été réalisée à l'Unité de Recherche sur les Maladies infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) au niveau de la faculté de Médecine et de pharmacie à l'université d'Aix-Marseille – France : réalisation de l'étude moléculaire.

1. Isolement des souches bactériennes :

Les souches bactériennes étudiées d'origine clinique non-répétitives ont été parvenues des différents établissements de santé dans des tubes de conservation (BioRad). Un isolement a été effectué pour chaque souche sur milieu MacConkey et Cétrimide . L'incubation a été faite à 37°C pendant 18 à 24h.

Pour les souches provenant du CHU Iben Sina -Annaba-, la collection a été effectuée au niveau du service des grands brûlés, les prélèvements des brûlés ont été réalisés par écouvillonnage sur les plaies infectées puis acheminés au laboratoire pour être incubés 18 à 24 heures dans du bouillon nutritif.

2. Identification des souches :

Après réalisation des examens microscopiques et culturaux, l'identification biochimique a été réalisée par le système API 20NE pour *Pseudomonas aeruginosa* , *Acinetobacter baumannii* et API 20E pour les entérobactéries ensuite confirmées par le MALDI-TOF MS.

2.1. Système API 20E et API 20NE (bio Mérieux, France) :

L'API est un système miniaturisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* API 20E et API 20NE pour *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. La lecture se fait à l'aide du tableau des réactions (**Annexe 1 et 2**), et l'identification est obtenue à l'aide d'un tableau analytique ou tableau d'identification (**Joffin, J.N., Leyral, G., 2006**).

2.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF :

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse extrêmement sensible, existant depuis près d'un siècle, permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt.

On peut schématiser un spectromètre de masse en 4 parties : le système d'introduction de l'échantillon, la chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse, l'analyseur, séparant les ions en fonction de leur rapport masse sur charge et le détecteur transformant le courant ionique en courant électrique. L'ionisation est l'étape la plus importante pour l'identification des molécules. (**Descy , J., et al., 2010**)

La spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur une technique d'ionisation mise au point dans les années 80 et conduisant à l'identification de biomarqueurs de poids moléculaires élevés : il s'agit d'une désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). L'échantillon à analyser est déposé sur une cible et traité par une matrice appropriée. Après introduction de la cible dans le système, elle est bombardée par un laser. Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF : Time-Of-Flight) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé qui peut être comparé à une banque de données de spectres. Notons que ce n'est que récemment que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été adaptée comme technique rapide, précise et peu coûteuse pour la routine des laboratoires de microbiologie. (Figure 1) (**Descy , J., et al., 2010**)

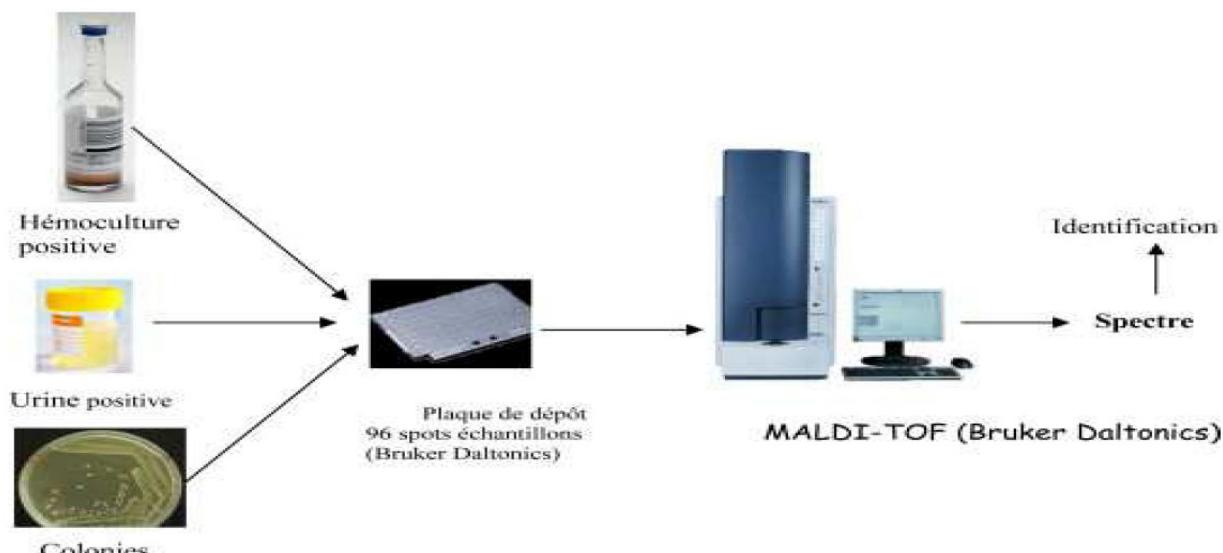


Figure N°1: Chaine d'identification par Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight « MALDI-TOF » à partir de colonie, d'échantillon d'hémocultures ou d'urines positives .

• **Matériel**

- Hotte chimique (Trionyx).
- Bain à ultrasons (Fisher).
- Spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker).
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) (Thermo).
- Centrifugeuse (Sigma).
- Cible (support métallique en acier inoxydable avec 96 puits) (Bruker).

• **Réactifs (Matrice)**

- Alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) (Sigma).
- Eau HPLC (VWR).
- Trifluoracetic acid (TFA) (Sigma).
- Acétonitrile (VWR).

La préparation de matrice est réalisée sous hotte chimique avec des gants lors de la manipulation des produits chimiques. La matrice doit être préparée avant chaque série d'analyse et conservée à 4 C° a l'abri de la lumière.

• **Protocole**

- Dans un tube Eppendorf 1,5ml, mettre 2 spatules (5mg) d'alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) .
- Ajouter 500 µl d'acétonitrile à 100%.
- Ajouter 475 µl d'eau HPLC.

- Ajouter 25 µl de Trifluoracetic acid (TFA).
- Vortexer ou secouer vigoureusement
- Soniquer pendant 10 min puis centrifuger 5 min à 13000 rpm.
- Transférer le surnageant dans un tube Eppendorf 1,5 ml propre, ainsi la matrice est prête à être utilisée.
- Déposer les échantillons sur la cible dans la zone appropriée en prélevant à l'aide d'une pointe du cône de pipette une colonie bactérienne de 24 heures de façon la plus homogène possible et de façon à obtenir une fine couche.
- Une fois tous les dépôts effectués, Déposer 1,5µl de matrice sur chaque spot.(ne pas toucher l'échantillon avec l'extrémité du cône).
- Laisser sécher pendant 5 min sous la PSM puis ranger la cible MALDI dans sa boite plastique
- Introduire la cible dans le spectromètre de masse Microflex.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control et lancer le spectromètre de masse.

Le résultat d'identification par MALDI-TOF est donné avec le logiciel MALDI Biotyper par un score compris entre zéro et trois. On considère qu'une bactérie est identifiée de façon fiable lorsque le score d'identification est supérieur à 1,9 (Tableau 7) (Seng, P., et al., 2009).

Tableau N°7 : Interprétation des scores obtenue par MALDI-TOF

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	Green
1.900 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	Green
1.700 ... 1.899	probable genus identification	(+)	Yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	Red

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

La sensibilité des souches *vis-à-vis* de 17 antibiotiques (Tableau 8)(15 antibiotiques pour les entérobactéries et 11 pour les bacilles à Gram négatif non fermentants) est déterminée par la

méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (Becton, Dickinson and Company, France) selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (www.sfm-microbiologie.org) . Des boites de gélose Mueller Hinton sontensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne de 0.5 Mac Farland diluée à 1/10ème (10^7 bactéries/ml), puis les disques d'antibiotiques (Bio-RAD) y sont déposés, ensuite incubées pendant 18 à 24h à 37°C. (avec l'utilisation des souches de référence *E. coli* ATCC 25922 pour les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pour les BGN non fermentants)

L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistant (R) est effectuée selon les critères définis par la CA-SFM (**CA-SFM, 2015**)

Tableau N°8: Liste des antibiotiques testés (**CA-SFM, 2015**)

Antibiotiques	Abréviations	Charge (µg)	Familles
Amoxicilline	AMX	10	Céphalosporine de 3ème génération (β -lactamines)
Amoxicilline+Ac.clavulanique	AMC	20/10	Aminopénicillines (β -lactamines)
Ticarcilline +Ac.clavulanique	TCC	75+10	Carboxypénicillines (β -lactamines)
Céfoxitine	FOX	30	Céphalosporine de 3ème génération (β -lactamines)
Céfotaxime	CTX	30	Céphalosporine de 3ème génération (β -lactamines)
Céftriaxone	CRO	30	Céphalosporine de 3ème génération (β -lactamines)
Céftazidime	CAZ	30	Céphalosporine de 3ème génération (β -lactamines)
Aztréonam	ATM	5	Monobactames (β -lactamines)
Imipénème	IPM	10	Carbapénèmes (β -lactamines)
Ertapénème	ERT	10	Carbapénèmes (β -lactamines)
Gentamicine	GEN	10	Aminosides
Amikacine	AMK	10	Aminosides

Ciprofloxacine	CIP	5	Quinolones
Colistine	COL	50	Polymyxines
Rifampicine	RIF	30	Rifamycines
Fosfomycine	FOS	10	Les acides fosfoniques
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	SXT	75 +10	Sulfamides

µg : microgramme , Ac : acide

4. Détermination des concentration minimales inhibitrices (CMI) par E. test :

Cette technique utilisant des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration d'antibiotiques, permet d'obtenir simplement et rapidement une détermination de la concentrations minimales inhibitrices (CMI) dans les mêmes conditions que l'antibiogramme standard. En routine, elle constitue une alternative acceptable à la méthode de référence.

La détermination des (CMI) de Imipénème (bacilles à Gram négatif non fermentants) et l'Ertapénème (Entérobactéries) est réalisée en utilisant des bandelettes E.test.

Après ensemencement par écouvillonnage d'une suspension bactérienne (10^7 bactéries/ml) sur gélose Mueller Hinton(MH), les bandelettes E.test sont déposées délicatement et les boites sont incubées pendant 18 à 24h à 37°C (Figure 2). (Une fois appliquée, la bandelette ne doit pas être déplacée).

L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistant (R) est effectuée selon les critères définis par la CA-SFM (**CA-SFM, 2015**)

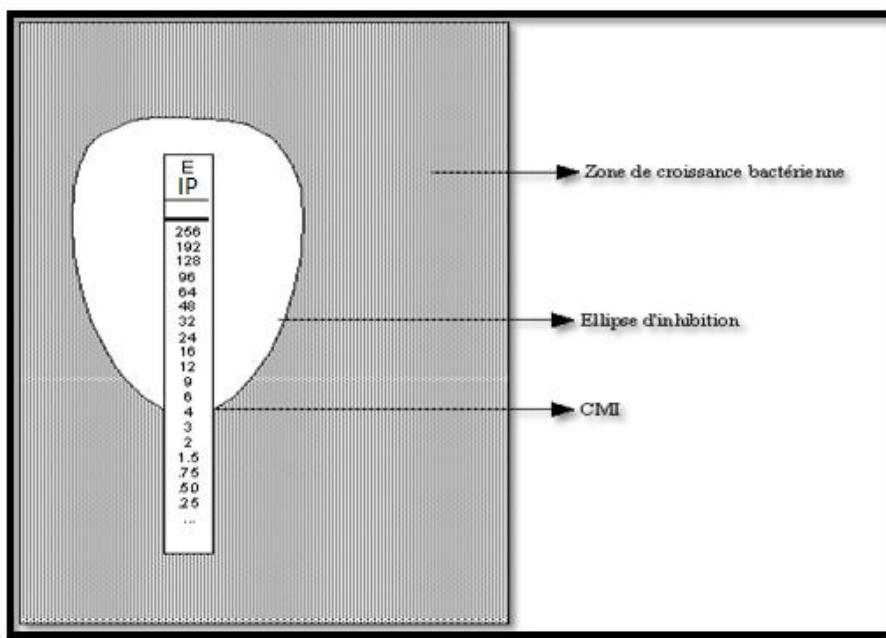


Figure N°2 : Détermination de la CMI par E.test.

5. Détection phénotypique des β -lactamases :

5.1. Recherche de la production des BLSE :

5.1.1. Test de synergie:

✓ **Principe :**

La démonstration phénotypique de la présence d'une β -lactamase à spectre élargi consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique.

✓ **Technique :**

Appliquer sur une gélose Mueller Hinton, préalablement ensemencée par l'isolat à tester, un disque de ceftazidime, céfotaxime, céf épime et d'aztréonam (30 μ g) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque de ticarcilline+ acide clavulanique (TCC) (75 μ g+10 μ g) pour *P. aeruginosa* et *A. baumannii* ou d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) (20 μ g+10 μ g) pour les entérobactéries. (Philippon, A., Arlet, G., 2006).

✓ **Lecture :**

Un résultat positif est noté lorsqu'une image de synergie est observée entre les deux disques.

5.1.2. Test de confirmation (Technique du double disque) :

Ce test est fait pour les souches qui ne présentent pas une image de synergie avec diminution des diamètres des céphalosporines de 3^{ème} génération et pour déterminer si il ya production d'une BLSE.

✓ **Technique :**

Pour les entérobactéries on dépose un disque d'AMC et un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (céfotaxime) à une distance de 30mm (centre à centre).

Pour *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* on dépose un disque de TCC avec un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (ceftazidime) ou monobactam (aztréonam) à une distance de 30mm.

Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse).

Après diffusion, on enlève le disque d'AMC (ou de TCC) et le remplacer par un disque de céfotaxime, ceftazidime ou aztréonam selon l'isolat.

- On incube la boîte 37°C pendent 24 H.

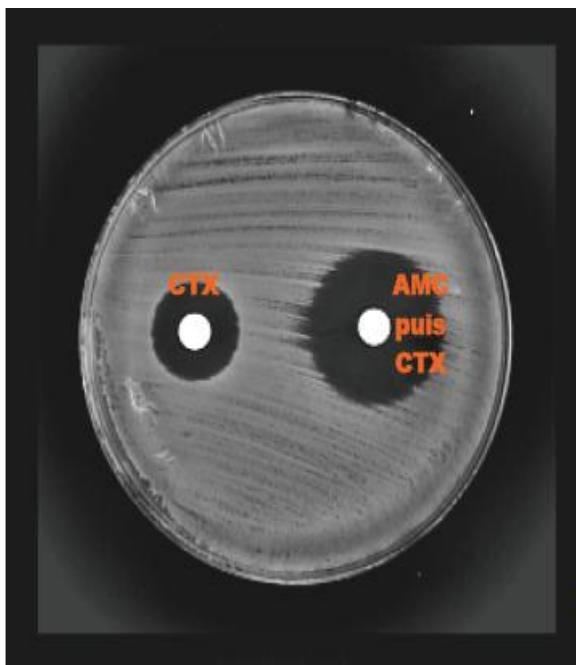


Figure N°3 : Test positif : mise en évidence d'une BLSE.

✓ **Lecture :**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3^{ème} génération appliqué après diffusion du disque AMC ou TCC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (Figure 3), ce qui indique une production d'une BLSE (**OMS, 2008**).

5.2. Recherche de la production des Carbapénèmases :

En pratique courante au sein des laboratoires de microbiologie, la détection des bactéries productrices des carbapénèmases s'appuie tout d'abord sur la détermination de la sensibilité des souches aux carbapénèmases quelle que soit la méthode utilisée.

5.2.1. Test de Hodge modifié :

Ce test est réalisé afin de mettre en évidence la production d'une carbapénémase pour les isolats qui présentent un profil de résistance à l'Imipénème ou à l'Ertapénème, le test est réalisé comme suit :

On ensemence par la méthode d'écouvillonnage une gélose MH ou Mac Conkey une suspension à 0,5 Mc Farland d'une souche d'*E. coli* sauvage ATCC 25922.

On dépose un disque d'imipénème ou d'ertapénème au centre de la boîte, puis on ensemence les isolats à tester par stries à partir du disque jusqu'à la périphérie de la boîte.

Après une nuit d'incubation à 37 °C, la déformation du diamètre d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* indique la production d'une carbapénémase qui hydrolyse l'imipénème ou l'ertapénème par l'isolat testé (Figure 4) (Lee, K., et al., 2010).

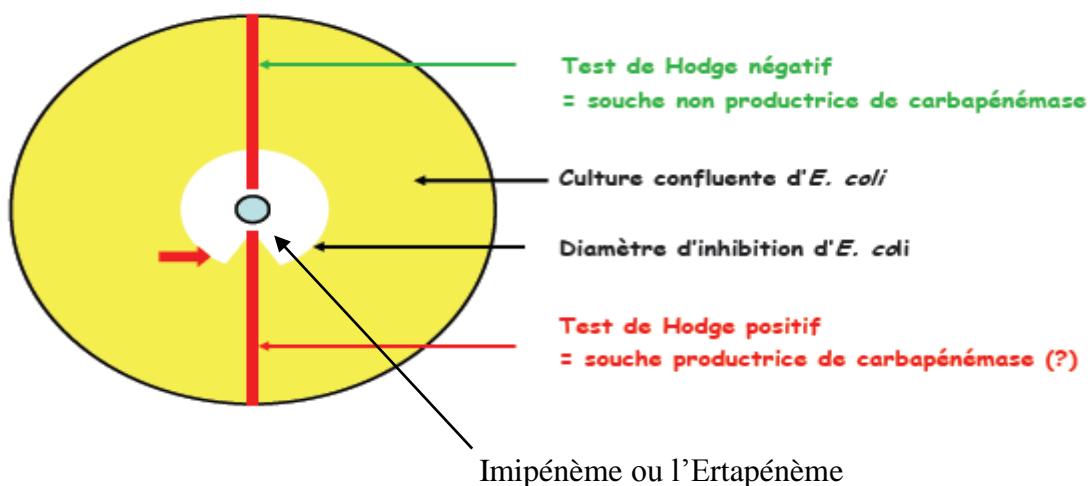


Figure N°4 : Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénèmases

5.2.2. Test à l'EDTA : (pour les métallo-β-lactamases (MβL)

Ce test est fait pour mettre en évidence la production des carbapénèmases de la classe B d'Ambler (métallo-β-lactamases) qui confèrent une résistance à l'imipénème, inhibées par l'EDTA (chélateur).

5.2.2.1. Méthode EDTA-disque synergie :

Un disque d'Imipénème (10µg) est déposé à deux centimètres d'un disque vierge auquel on ajoute 10µl d'EDTA ; Après incubation à 37°C pendant 24heures, si on observe une synergie entre les deux disques on considère que ces souches sont productrices de MBL. (Yong, D., et al., 2002)

5.2.2.2. Méthode des disques combinés :

Dans cette méthode, on dépose deux disques d'imipénème à deux centimètres d'intervalle auxquels on rajoute à l'un d'eux 5µl d'EDTA (solution 0.5M, PH 8). Les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C. Si les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul d'au moins 6 mm, elles sont considérées comme souches productrices de MBL (Yong, D., et al., 2002)

5.2.3. Test Carba NP modifié :

Le test se base sur la détection directe de l'hydrolyse des carbapénèmes par les bactéries productrices des carbapénémases. Il détecte donc uniquement la résistance aux carbapénèmes transmissibles évitant ainsi au patient un isolement non nécessaire. Grâce à sa spécificité et sa sensibilité élevées (Figure 5)

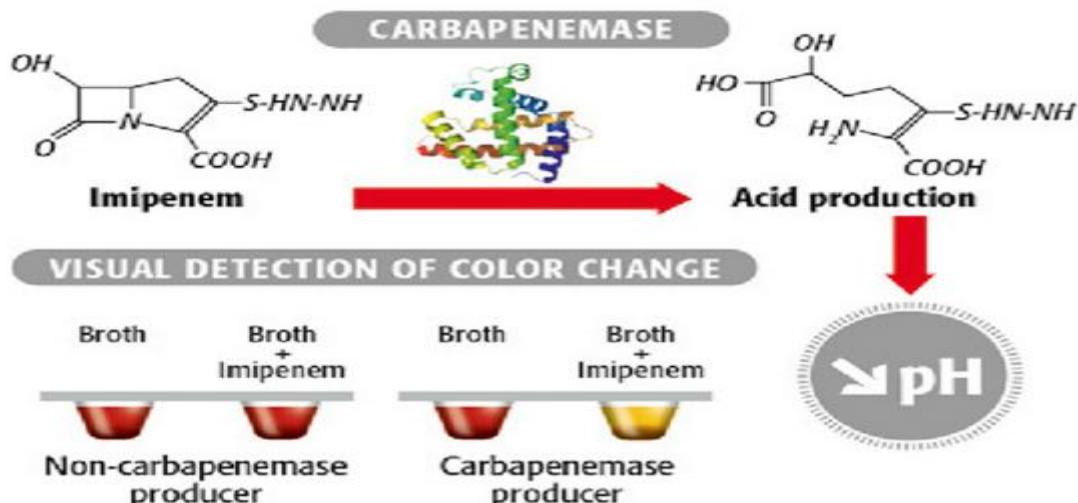


Figure N°5: Principe du test Carba NP modifié

✓ Réactifs

- Imipénème (Merck Sharp & Dohme, France) (Poudre pour solution injectable IV).

- Tampon de lyse: CTAB (Sigma-Aldrich).
- Rouge de Phénol en poudre (Sigma-Aldrich).
- ZnSO₄, 7 H₂O en poudre (Sigma-Aldrich).

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

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

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

- Dans un tube Eppendorf, mettre 200µl de tampon de lyse (CTAB 0.02 %).
- Suspendre une ose calibrée (10µl) de colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer 1 à 2 min.
- Transférer 100µl dans 2 tubes Eppendorf "A" et "B".
- Ajouter 100µl de Solution A dans le tube Eppendorf "A" et 100µl de la Solution A+imipénème 6mg/ml dans le tube Eppendorf "B".
- Vortexer 5 sec puis incuber à 37°C pendant un maximum de 2h.

La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube Eppendorf et les résultats sont interprétés selon le tableau ci-dessous.(Tableau 9) (**Bakour, S., et al., 2015 c**)

Tableau N°9 : Interprétation des résultats du Carba NP test modifié.

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production de carbapénémase (Figure 6)
Rouge	Orange/Jaune	Production de carbapénémase (Figure 7)
Jaune	Jaune	Non interprétable (Figure 8)

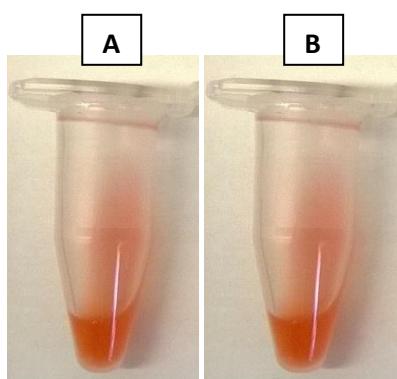


Figure N°6 : Pas de production

de carbapénémase

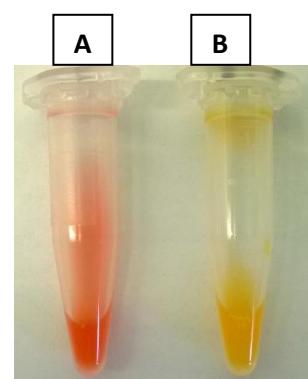


Figure N°7 : production

de carbapénémase

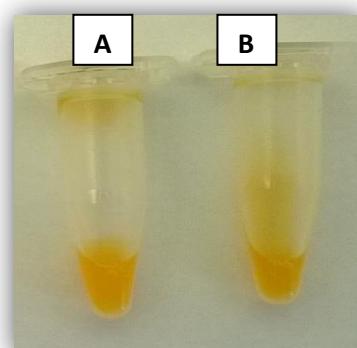


Figure N°8 : résultat non interprétable

6. Détection moléculaires des β -lactamases :

6.1. Extraction de l'ADN :

l'extraction d'ADN a été effectuée par l'automate EZ1 (BioRobot de QIAGEN). La technique des particules magnétiques donne à l'ADN une haute qualité. Le rendement dépend de la souche de bactéries, de la densité, du volume d'échantillon et du volume d'élution. L'extraction dure 15 minutes. Le tampon ainsi que la protéinase K vont permettre d'éliminer les protéines et de libérer les acides nucléiques de l'ADN. Quand cette étape est terminée, les acides nucléiques sont capturés par les particules magnétiques qui vont être lavées à plusieurs reprises. Lors de l'élution, l'eluât se détache des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient.

✓ Protocole

Mettre 190 μ l de Tampon G2 dans des tubes carrés +10 μ l de protéinase K.

Ajouter quelques colonies bactériennes.

Bien vortexer.

On place les tubes et les instruments nécessaires dans l'appareil EZ1 et on insère la carte EZ1 DNA Bacteria dans l'automate.

Après avoir appuyé sur START, suivre les instructions de l'appareil

✓ Remarque :

Le volume d'élution est 50 μ l

6.2. Polymérase Chain Réaction (PCR) en temps réel :

la PCR en temps réel permet de suivre cycle après cycle l'évolution de la réaction PCR et la quantité d'ADN cible synthétisé, grâce à un marqueur fluorescent.

Une des applications majeur de la PCR en temps réel est qu'elle permet d'obtenir une quantification absolue ou relative de la quantité initiale d'ADN cible (ou ARN), ce qui était très difficile à obtenir en PCR classique (PCR en point final).

Dans notre travail le couple d'amorce utilisé est montré dans le (Tableau 10). Le protocole utilisé est le suivant : dans une plaque pour Thermocycleur **Stratagème MX 3000P**, on dépose 20 μ l du mélange réactionnel (Tableau 11) dans chaque puits, par la suite introduire dans le thermocycleur (Figure 9).

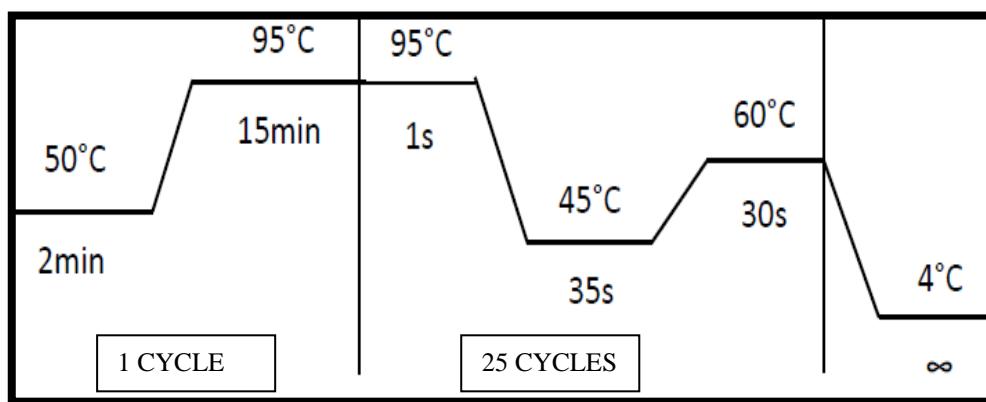
Tableau N°10 : Amorces et sondes utilisées pour les PCR en temps réel

Gène	Contrôle positive	Référence contrôle	Amorce	Séquence 5'---3'	Taille (bp)	Référence
Bla TEM	Kpnasey	Diene, S.M., et al., 2011	F	TTCTGCTATGTGGTGCAGTA	213	JM-lab
			R	GTCCTCCGATCGTTGTCAGA		
			probe	AACTCGGTGCCGCATACACTATTCT-T		
Bla CTXMA	Kpnasey	Diene, S.M., et al., 2011	F	CGGGCRATGGCGCARAC	105	Roschanski , N., et al., 2014
			R	TGCRCGGTSGTATTGCC		
			probe	CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC		
Bla SHV	Kpnasey	Diene, S.M. ,et al., 2011	F	TCCCAGATGAGCACCTTAAA	105	Roschanski, N. et al., 2014
			R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT		
			probe	TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG		
Bla OXA-48	E.coli CMUL64	AL-bayssari, C., et al., 2014	F	TCTTAAACGGGCGAACCAAG	125	JM-lab
			R	GCGTCTGTCCACCCACTTA		
			probe	6-FAM-AGCTTGATGCCCTCGATTGG-TAMRA		
Bla OXA-23	A. baumannii ABLSac-coliR	Rolain, J.M., et al., 2013	F	TGCTCTAACCGCGCAAATA	130	Mesli, E., et al.,2013
			R	TGACCTTTCTGCCCTTCC		
			probe	FAM-GCCCTGATGGATTGGAGAACCA-TAMRA		
Bla OXA-24	A. baumannii OXA-24	Bakour, S., et al., 2012	F	CAAATGAGATTTCAAATGGGATGG	123	Mesli, E., et al.,2013
			R	TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT		
			probe	FAM-GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA-TAMRA		
Bla OXA-58	A. baumannii 308	Touati, M., et al., 2012	F	CGCAGAGGGGAGAACCGTCT	102	Mesli, E., et al.,2013
			R	TTGCCCATCTGCCCTTTCAA		
			probe	FAM-GGGGAATGGCTGTAGACCCGC-TAMRA		
Bla NDM-1	Kpnasey	Diene, S.M., et al. , 2011	F	GCGAACACAGCCTGACTTT	155	Diene, S.M., et al. , 2011
			R	CAGCCACCAAAAGCGATGTC		
			probe	FAM-CAACCGCGCCCAACTTGGC-TAMRA		
Bla KPC	Kpnasey	Diene, S.M., et al. , 2011	F	GATACCACGTTCCGTCTCCA	180	JM-lab
			R	GGTCGTTAGCC		
			probe	FAM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA		
Bla VIM	P. aeruginosa VIM-2	AL-bayssari, C., et al., 2014	F	CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA	132	JM-lab
			R	GCGTACGTYGCCACYCCAGCC		
			probe	FAM-AGTCTCCACGCACTTCATGACCGCGT CGGCG-TAMRA		

pb: paire de base ; F: Forward ; R: Reverse JM-lab : jean marc laboratoire

Tableau N°11 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR en temps réel

Composants	Quantité PCR en temps réel
Quantitect Probe PCR Master Mix	10 μ l
Amorce Forward	0.5 μ l
Amorce Reverse	0.5 μ l
Sonde	2 μ l
H2O distillé	2 μ l
ADN à amplifier	5 μ l
Volume total	20 μ l

**Figure N°9 :** Programme de l'amplification de la PCR en temps réel

6.3. Polymérase Chain Réaction(PCR) standard :

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour se faire, une série de étapes permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Pour avoir réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes :

Etape de dénaturation, est réalisée à environ 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.

Etape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amores (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amores / matrice est réalisé.

Etape de polymérisation à 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

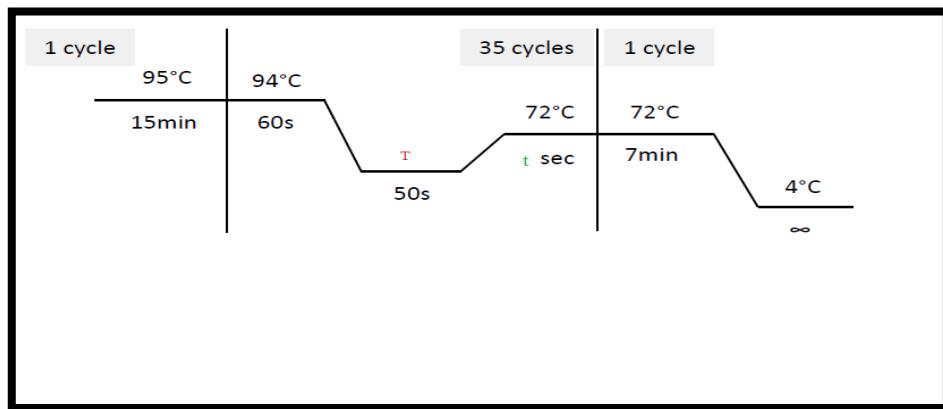
Le protocole utilisé pour effectuer une PCR standard est le suivant : dans une plaque pour Thermocycleur on dépose 25 µl du mélange réactionnel (Tableau 12,13) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur. (Figure10)

Tableau N°12: Amorces utilisées pour les PCR standard

Gène	Contrôle positive	Référence contrôle	Amorce	Séquence 5'---3'	Taille (bp)	Référence
Bla TEM	Kpnasey	Diene , S.M., et al., 2011	F	ATGAGTATTCAACATTCCGT G	861	Kruger, T., et al., 2004
			R	TTACCAATGCTTAATCAGTGA G		
Bla CTXM-A	Kpnasey	Diene, S.M. , et al., 2011	F	CCCATGGTTAAAAAATCACT GC	944	Roschanski, N., et al., 2014
			R	CAGCGCTTTGCCGTCTCCG		
Bla SHV	Kpnasey	Diene, S.M., et al., 2011	F	ATTTGTCGCTTCTTACTCGC	1051	Yagi, T., et al., 2014
			R	TTTATGGCGTTACCTTGACC		
Bla OXA-48	<i>E.coli</i> CMUL64	AL-bayssari, C., et al., 2014	F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744	Poirel, L., et al., 2010
			R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC		
Bla OXA-23	<i>A. baumannii</i> ABL _{sac} -coliR	Rolain, J.M. , et al., 2013	F	GATCGGATTGGAGAACCGAGA	501	Kusradze, Ia. et al., 2011
			R	ATTCTGACCGCTTCCAT		
Bla OXA-24	<i>A. baumannii</i> OXA-24	Bakour, S., et al., 2012	F	ATGAAAAAATTATACTTCCTAT ATTAGC	828	Ruiz, M., et al., 2007
			F	TTAAATGATTCCAAGATTTC TAGC		
Bla OXA-	<i>A. baumannii</i> 308	Touati, M. , et al., 2012	F	AAGTATTGGGCTTGTGCTG	599	Amudhan, S.M., et al., 2011
			F	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
Bla NDM	Kpnasey	Diene, S.M., et al. , 2011	F	CATTTGCGGGTTTTAATG	1022	Diene, S.M. , et al. , 2011
			R	CTGGGTCGAGGTCAAGGATAG		
Bla KPC	Kpnasey	Diene, S.M., et al. , 2011	F	ATGTCACTGTATGCCGTCT	893	Diene, S.M., et al. , 2011
			R	TTTCAGAGCCTTACTGCC		
Bla VIM	<i>P. aeruginosa</i> VIM-2	AL-bayssari, C., et al., 2014	F	ATTGGTCTATTGACCGOGTC	780	El-Ageery, S.M., Al-Hazmi, S.S., 2014
			R	TGCTACTCAACGACTGOGCG		
OprD	-	-	F	GGAACCTCAACTATCGC CAAG	1468	Ocampo-Sosa, AA., et al., 2012
			R	GTTGCCTGTCGGTCGAT TAC		

Tableau N°13 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard

Composants	Quantité PCR standard
Quantitect Probe PCR Master Mix	12.5 µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
H2O distillé	6.5 µl
ADN à amplifier	5 µl
Volume total	25 µl

**Figure N°10 :** Programme de la PCR standard

T : Température d'hybridation, variable selon l'amorce utilisée.

t : temps d'elongation, variable selon la taille du fragment à amplifier

6.4. Electrophorèse sur gel d'agarose :

La technique de l'électrophorèse sur gel est utilisée pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible

✓ Matériel et réactifs

- Cuve à électrophorèse + Support de gel + Peignes.
- Système d'imagerie pour gels avec UV (E-BOX VILBER).
- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5X (Euromedex).
- Solution de BET (Sigma).
- Marqueurs de poids moléculaire (BenchTop pGEM® DNA).
- Tampon de charge Blue Juice 10X (Blue Juice™).
- Agarose (Invitrogen).

✓ **Préparation du gel d'agarose**

Dans un Erlené en verre, mélanger 4g de poudre d'agarose avec 400ml de TBE à 0.5X.

Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.

Laisser refroidir.

Ajouter du BET (100 µl pour 50ml) et mélanger bien.

Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.

✓ **Electrophorèse des produits d'amplification**

1- Retirer les peignes après polymérisation du gel.

2- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.

3- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 0.5X (le gel doit être totalement émergé).

4- Déposer 5µl du marqueur de poids moléculaire dans le premier puits.

5- Mélanger 4 µl du produit amplifié avec le Blue Juice (1 µl).

6- Déposer les produits amplifiés et les deux témoins (positif et négatif).

7- Fermer le couvercle de la cuve, brancher la cuve au générateur, et mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (environ 30 min).

8- Une fois la migration finie, placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes. (Figure 11)

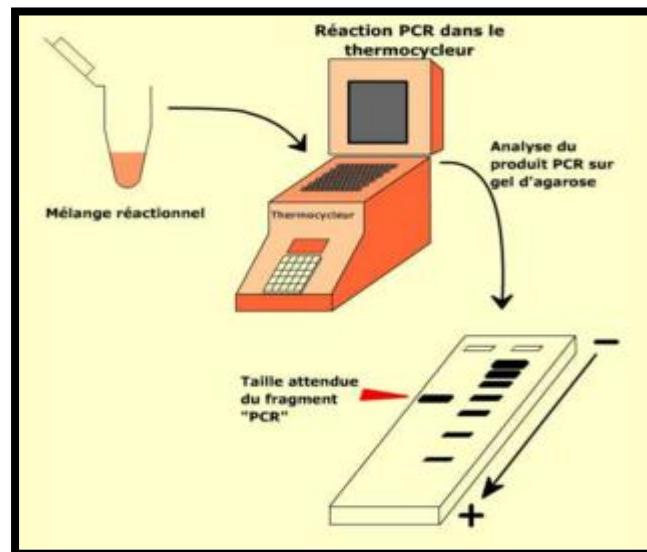


Figure N°11 : Analyse du produit PCR sur gel d'agarose

6.5. Séquençage :

Le séquençage a été effectuée selon la méthode de Sanger modifiée (**Sanger, F., et al., 1992**), en utilisant le kit Big Dye Terminator v 3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3130XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States), selon les recommandations du constructeur. Les séquences sont ensuite analysées avec le logiciel Codon Code Aligner. La séquence ainsi corrigée est analysée par ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) (**Gupta, S. K., et al., 2014**).

6.5.1. Purification :

- Dans une plaque à filtre, mettre le produit de PCR (PCR Standard) + 100 µl d'eau UTP(Eau Ultra-pure).
- Filtration sous vide pendant 30 min.
- Ajouter 50µl d'eau UTP.
- Agiter pendant 20 min

6.5.2. PCR BigDye :

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR Big Dye est le suivant:

Dans une plaque de thermocycleur (Bio-rad) on dépose 20µl du mélange réactionnel (Tableau 14) dans chaque puits et selon le programme décrit ci-dessous (Figure 12)

Tableau N°14 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR BigDye

Composants	Quantité PCR BigDye
Buffer	3 µl
Mix BigDye	2 µl
Amorce (Reverse ou Forward)	1 µl
H2O distillé	10 µl
ADN à amplifier	4 µl
Volume total	20 µl

ADN à amplifier = produit de PCR standard purifié

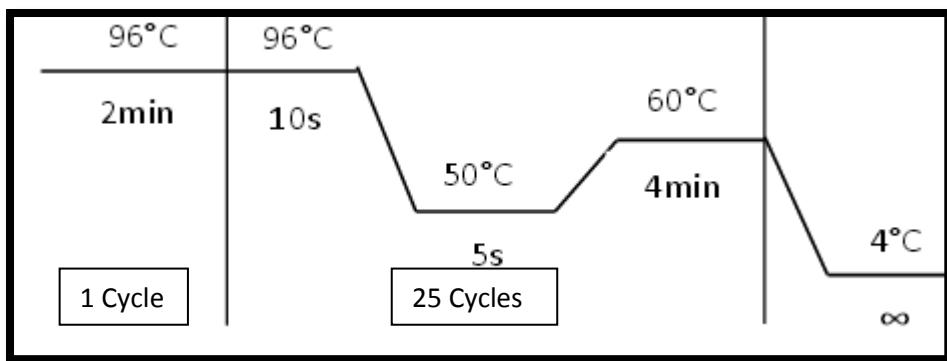


Figure N°12 : Programme de la PCR BigDye

6.5.3. Purification par Sephadex :

- Mettre la poudre Sephadex dans la plaque à filtre, ajouter 300µl d'eau UTP et laisser 2 à 3 heures.
- Mettre une plaque en dessous de la plaque à filtre pour récupérer l'eau après centrifugation. (l'eau est jetée par la suite).
- Centrifuger à 1200 rpm pendant 2 min à 10°C.
- Mettre le produit de la PCR BigDye dans la plaque à filtre + une plaque en dessous pour récupérer le produit centrifugé (plaque pour séquençage (Millipore)).
- Centrifuger à 1200 rpm pendant 2 min à 10°C.
- Récupérer le produit centrifugé destiné à séquencer, ensuite cette plaque est recouverte par un tapis de protection.
- Introduire tous les données concernant le produit à séquencer dans l'ordinateur lié au séquenceur.
- Préparer la plaque pour le séquençage (mettre le support).
- Mettre la plaque dans le séquenceur (Automate ABI 3130XL) et lancer le séquençage.

6.6. Analyse des séquences d'ADN :

La correction et l'analyse des séquences brutes obtenues ont été faites par le logiciel codon code aligner. Comparer les séquences via internet avec les séquences homologues retrouvées dans la banque informatique internationale « Gen Bank » et l'argannote. Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage de similarité de la souche à étudier avec les espèces les plus proches pour déterminer leur affiliation génétique. Après le BLAST on peut construire des arbres phylogéniques des gènes étudiés à l'aide du logiciel MEGA 6 selon la méthode du « Neighbor-joining » (**Tamura, K., et al., 2007**)

6.7. Typage des souches :

6.7.1. Biotypage par MALDI-TOF :

Dans cette méthode, a partir des résultats obtenus par MALDI-TOF, un biotypage des BGN grâce au logiciel Biotyper Bruker 3.0 au niveau de distance arbitraire 500 est réalisé qui permet de comparer les spectres du profils protéiques ou scores des bactéries et les rassembler en cluster puis les cluster en clones dans un dendrogramme MSP(Main spectra). Cette comparaison nous permet aussi d'avoir un aspect épidémiologiques des souches qu'on veut étudier.

6.7.2. Génotypage par MLST : (*Multi-locus sequence typing*) :

MLST est une technique de génotypage basée sur le séquençage de 5 à 10 gènes de ménage « house keeping genes », importants dans le métabolisme de la bactérie.

Le MLST a été proposé pour la première fois en 1998 pour caractériser les souches de *Neisseria meningitidis* (**Maiden, M.C., et al., 1998**). Aujourd’hui le MLST est utilisé pour plus de cinquante espèces bactériennes telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus agalactiae*, *Helicobacter pylori*, etc.. (<http://www.mlst.net/>).

Le principe du MLST est de comparer des séquences d'ADN de gènes de ménage (habituellement 7 gènes) , approximativement 400 à 500 pb de chaque gène vont être séquencées (après avoir été amplifiées par PCR). Pour chaque gène, les séquences obtenues vont être comparées et des numéros d'allèles sont assignés à chaque séquence unique. Pour un gène donné, deux souches qui ont la même séquence nucléotidique portent le même numéro d'allèle et les séquences différentes même d'un seul nucléotide sont considérées comme des allèles distincts. Chaque souche est défini par la combinaison des numéro correspondant aux allèles des locus étudiés, ce qui définit un profil allélique ou « séquence type » (ST) (**Maiden, M.C., et al., 1998**).

La recherche des numéros d'allèle et de ST est réalisée en ligne sur le site internet dédié au système MLST d'une espèce bactérienne donnée. L'énorme avantage de cette approche est qu'elle est parfaitement reproductible quel que soit le laboratoire puisqu'il s'agit de séquencer et de classer les séquences. Il n'y a pas d'ambiguïté d'interprétation des résultats comme avec des profils de migration multibandes.

Pour *A. baumannii* le MLST a été développée par *Bartual et al.* en 2005 (**Bartual, S.G, et al., 2005**) .Cette méthode est basée sur 7 gènes (gènes de ménage) (Tableau 15).

Pour *P. aeruginosa* le MLST a été développée et mise au point par Curran et al., 2004 (**Curran, B, et al., 2004**) et par Van Mansfeld R et al., 2009 (**Van, M.R., et al., 2009**). Elle est basée sur l'analyse par les séquençages nucléotidiques des 7 gènes acsA, aroE, mutL, ppsA, guaA, nuoD, et trpE (Tableau 16), repartis sur le chromosome bactérien et conservés au cours de l'évolution.

Pour *K. pneumoniae* le MLST a été développée et mise au point par *Diancourt et al* en 2005 (**Diancourt, L., et al., 2005**). Cette méthode aussi est basée sur 7 gènes (gènes de ménage) (Tableau 17).

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

Tableau N°15 : Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage pour *Acinetobacter baumannii*

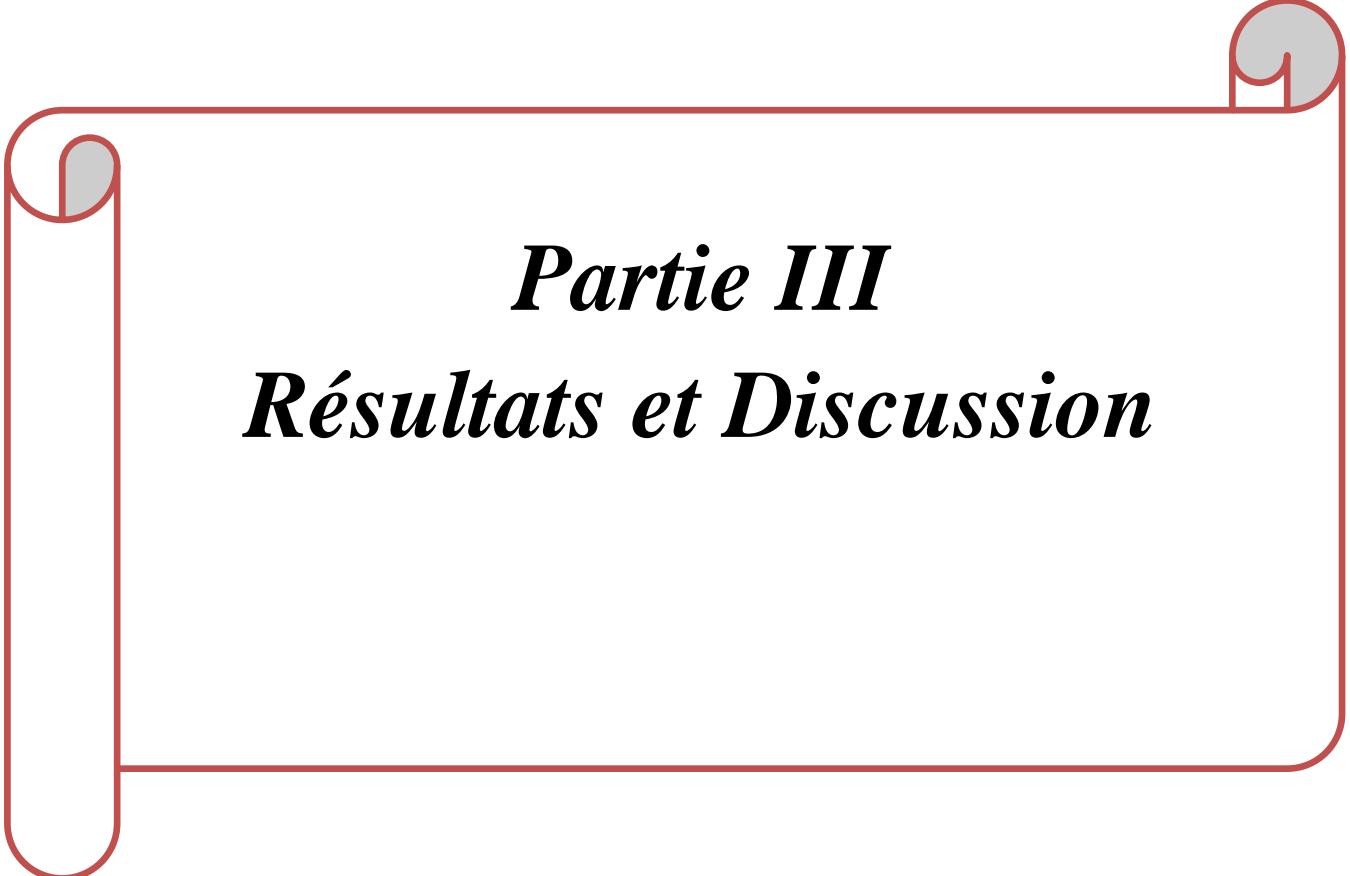
Technique	Gène	Amorce	Séquence 5'---3'
PCR et Séquençage	cpn60 (60-KDa chaperonin)	cpn60-F	ACTGTACTTGCTCAAGC
		cpn60-R	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG
	fusA (elongation factor EF-G)	fusA-F	ATCGGTATTCCTGCKCACATYGAT
		fusA-R	CCAACATACKYTGWACACCTTGT T
	gltA (citrate synthase)	gltA-F	AATTACAGTGGCACATTAGTCCC
		gltA-R	GCAGAGATACCAGCAGAGATACAC G
	pyrG (CTP synthase)	pyrG-F	GGTGTGTTTCATCACTAGGWAAA GG
		pyrG-R	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCA CCMA
	recA (homologous recombination factor)	recA-F	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC
		recA-R	GTTTCTGGGCTGCCAACATTAC
	rplB (50S ribosomal protein L2)	rplB-F	GTAAGAGCGTATTGAATACGATCCT AACC
		rplB-R	CACCACCACCRGYGGGTGATC
	rpoB (RNA polymerase subunit B)	rpoB-F	GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACC A
		RpoB-R	GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC

Tableau N°16: Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage pour *Pseudomonas aeruginosa*

Technique	Gène	Amorce	Séquence 5'---3'
PCR	acsA(Acetyl coenzyme A synthetase)	acsA-F	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC
		acsA-R	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT
Séquençage	aroE (Shikimate dehydrogenase)	aroE-F	TGGGGCTATGACTGGAAACC
		aroE-R	TAACCCGGTTTGTGATTCTACA
	guaA (GMP synthase)	guaA-F	CGGCCTCGACGTGTGGATGA
		guaA-R	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA
	mutL(DNA mismatch repair protein)	mutL-F	CCAGATGCCGCCGGTGAGGTG
		mutL-R	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC
	nuoD(NADH dehydrogenase I chain C, D)	nuoD-F	ACCGCCACCCGTACTG
		nuoD-R	TCTCGCCCATCTTGACCA
	ppsA(Phosphoenolpyruvate synthase)	ppsA-F	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG
		ppsA-R	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG
	trpE(Anthralite synthetase component I)	trpE-F	GCGGCCAGGGTCGTGAG
		trpE-R	CCCGCGCTTGTGATGGTT
	acsA(Acetyl coenzyme A synthetase)	acsA-F	GCCACACCTACATCGTCTAT
		acsA-R	AGGTTGCCAGGTTGTCCAC
	aroE(Shikimate dehydrogenase)	aroE-F	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG
		aroE-R	TGAAGGCAGTCGGTTCCCTTG
	guaA (GMP synthase)	guaA-F	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC
		guaA-R	GACGTTGTGGTGCAGCTTGA
	mutL(DNA mismatch repair protein)	mutL-F	AGAAGACCGAGTCGACCAT
		mutL-R	GGTGCATAGAGGAAGTCAT
	nuoD(NADH dehydrogenase I chain C, D)	nuoD-F	ACGGCGAGAACGAGGACTAC
		nuoD-R	TGGCGGTCGGTGAAGGTGAA
	ppsA(Phosphoenolpyruvate synthase)	ppsA-F	GGTGACGACGGCAAGCTGTA
		ppsA-R	GTATCGCCTCGGCACAGGA
	trpE(Anthralite synthetase component I)	trpE-F	TTCAACTCGGCGACTTCCA
		trpE-R	GGTGTCCATGTTGCCGTTCC

Tableau N°17 : Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage des 7 gènes de Ménage pour *Klebsiella pneumoniae*

Technique	Gène	Amorce	Séquence 5'---3'
PCR	rpob (beta-subunit of RNA polymerase)	rpob-F	GGCGAAATGGCGWGAGAACCA
		rpob-R	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC
Séquençage	gapA(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	gapA-F	TGAAATATGACTCCACTCACGG
		gapA-R	CTTCAGAACGGCTTGATGGCTT
PCR	mdh (malate dehydrogenase)	mdh-F	CCCAACTCGCTTCAGGTTCA
		mdh-R	CCGTTTTCCCCAGCAGCAG
Séquençage	pgi (phosphoglucose isomerase)	pgi-F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTG GC
		pgi-R	CGCGCCACGCTTATAGCGGTTAT
PCR	phoeE (phosphorine E)	phoeE-F	ACCTACCGAACACCGACTTCTTC GG
		phoeE-R	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT
Séquençage	infB (translation initiation factor 2)	infB-F	CTCGCTGCTGGACTATATTG
		infB-R	CGCTTCAGCTCAAGAACTTC
PCR	tonB (periplasmic energy transducer)	tonB-F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT
		tonB-R	ATTGCCGGCTGRGCRGAGAG
Séquençage	Amorce universelle	F	TTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
		R	TTGTGAGCGGATAACAATTTC



Partie III

Résultats et Discussion

1. Identification des souches bactériennes :

Au total 186 souches des bacilles à Gram négatif ont été isolées (114 souches issues à Annaba , 47 souches issues au Skikda et 25 souches issues à Guelma).

L'identification des souches a été déterminée par API20NE ou API20E (système d'identification) à l'aide d'une feuille de calcul du logiciel Excel ensuite par le MALDI-TOF MS (Figure 13) elle a donné de très bons scores d'identification confirmant l'identification par le système API et permet de diviser les BGN en deux grands groupes : entérobactéries 161 (84.4%), et 25 (13.3%) aux groupe des bacilles à Gram négatif non fermentants .

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (-) (C)	A1	not reliable identification	1.31	not reliable identification	1.294
<u>A2</u> (+) (B)	A2	<i>Escherichia coli</i>	1.841	<i>Escherichia coli</i>	1.82
<u>A3</u> (++) (A)	A3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.985	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.98
<u>A4</u> (++) (A)	A4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.015	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.965
<u>A5</u> (++) (A)	A5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.032	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.024
<u>A6</u> (++) (A)	A6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.103	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.968
<u>A7</u> (++) (A)	A7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.103	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.065
<u>A8</u> (++) (A)	A8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.109	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.105
<u>A9</u> (++) (A)	A9	<i>Proteus mirabilis</i>	2.159	<i>Proteus mirabilis</i>	2.138

Figure N°13 : Scores d'identification bactérienne obtenue par le MALDI-TOF.

1.1. Répartition des souches selon l'espèce :

Parmi les 161 souches des entérobactéries , la dominance a été attribuée à *Klebsiella spp.* N= 55 (Tableau 18), suivie par *Escherichia coli* N= 54 (Tableau19), *Enterobacter spp.* N=17 (Tableau20), *Proteus spp.* N= 12 (Tableau21), *Serratia spp.* N= 10 (Tableau22) , *Morganella morganii* N=8 (Tableau23), *Providencia spp.* N=3 (Tableau24), *Citrobacter spp.* N=2 (Tableau25), et 25 non fermentants : 7 *A. baumannii* (Tableau 26) et 18 *P. aeruginosa* (Tableau27) (Figure14;Figure15).

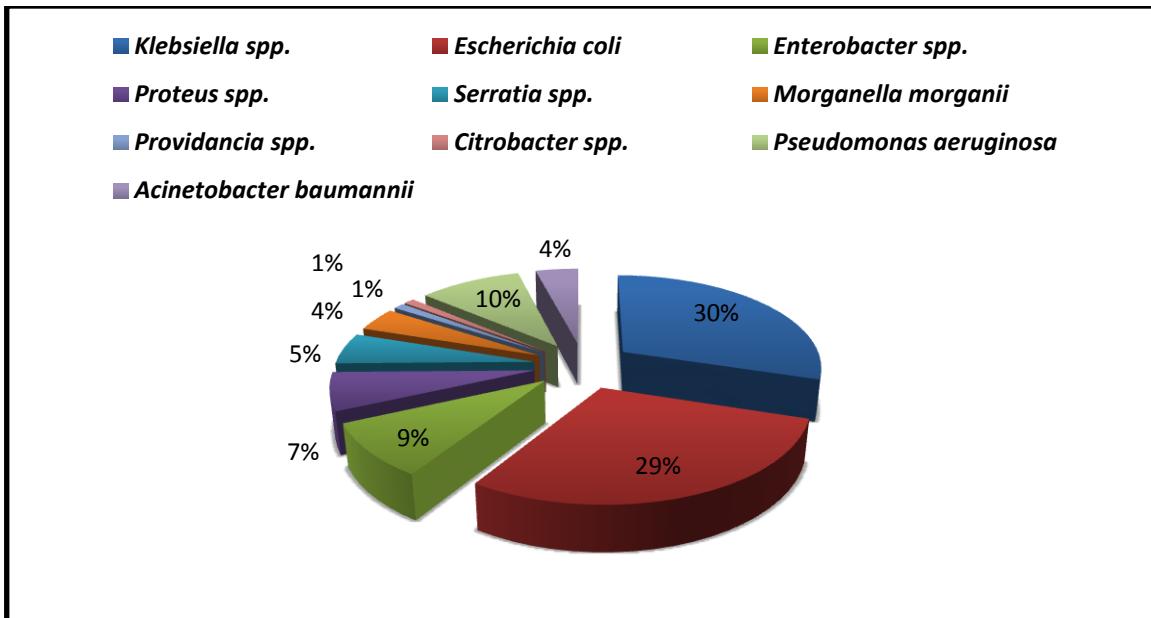


Figure N°14 : Répartition des bactéries à Gram négatif selon les espèces

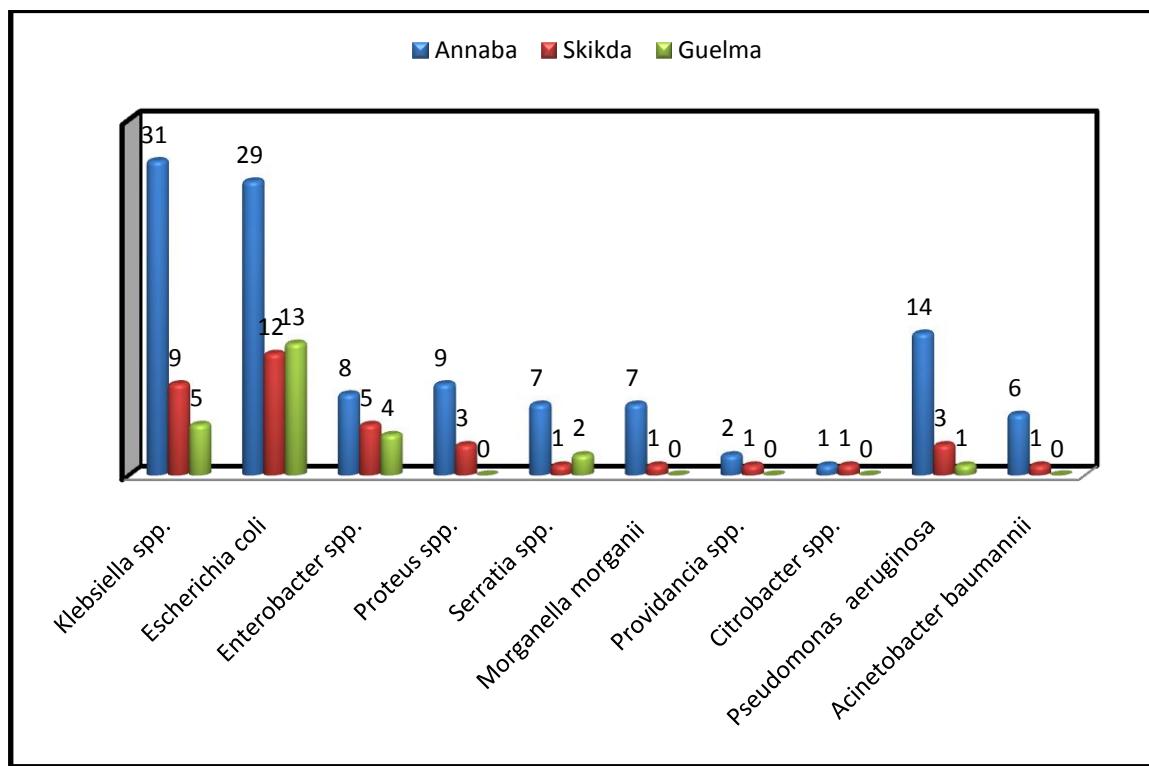


Figure N°15 : Répartition des espèces selon la ville

Tableau N°18 : Caractérisation des souches de *Klebsiella spp.* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF	Espèce type
1	27-08-2013	El-Hadjar-Annaba-	Traumatologie	Pus	F	65ans	1,98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	27-08-2013	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgicale Homme	Pus	M	45ans	1,98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	23-06-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	M	39jours	1,95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	14-07-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	F	31ans	2,01	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	18-07-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Médecine interne	Urine	F	30ans	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	13-03-2013	Ibn Zohr - Guelma-	Médecine interne	Urine	F	25ans	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7	17-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	M	15jours	1,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	17-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	M	1mois	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	21-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	F	40jours	1,98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	26-8-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Urine	F	28ans	1,89	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
11	5-7-2013	El-Hadjar-Annaba-	Pédiatre	Pus	M	9ans	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	13-12-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	F	69ans	1,98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	19-11-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	M	65ans	1,99	<i>Klebsiella oxytoca</i>
14	9-12-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	F	34ans	1,98	<i>Klebsiella oxytoca</i>
15	11-03-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	M	24ans	2,1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
16	20-08-2014	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Chirurgie femme	Pus	F	50ans	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
17	5-3-2014	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Médecine interne	Pus	F	50ans	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
18	22-12-2014	CHU Iben Sina Annaba	Brûlés	Pus	F	34 ans	2,04	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
19	28-11-2014	El-Hadjar-	Bloc	Pus	M	24ans	2,03	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

		Annaba-						
20	06-05-2014	El-Hadjar-Annaba-	Bloc	Pus	M	78ans	1,96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
21	28-06-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Urologie	Urine	M	43ans	2,03	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
22	14-03-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Pus	F	52ans	2,14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
23	12-12-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Médecine interne	Pus	F	33ans	1,98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
24	12-03-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Pus	F	53ans	2,05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	3-3-2014	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Médecine interne	Pus	M	49ans	2,15	<i>Klebsiella oxytoca</i>
26	5-06-2013	Ibn Zohr – Guelma-	Chirurgicale Homme	Urine	M	42 ans	1,99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
27	09-03-2015	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Chirurgie générale	Urine	F	21 ans	2,1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
28	20-10-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	M	28ans	1,99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
29	31-05-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Urologie	Urine	F	43ans	1,99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
30	02-12-2014	CHU Iben Sina Annaba	Brûlés	Pus	F	11ans	1,97	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
31	13-03-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	F	40ans	2,9	<i>Klebsiella oxytoca</i>
32	08-03-2015	Abderrezak Bouhara Skikda	Urgence	Urine	F	51 ans	1,97	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
33	17-09-2014	El-Hadjar-Annaba-	Médecine Interne	Pus	M	35ans	2,01	<i>Klebsiella oxytoca</i>
34	04-03-2014	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Sang	F	32ans	1,87	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
35	02-03-2014	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgicale Femme	Urine	F	52ans	1,95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
36	28-06-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Urologie	Urine	F	32 ans	1,82	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
37	09-03-2015	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Médecine interne	Pus	M	56 ans	1,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
38	08-03-2015	Nouaouria	Pédiatre	Urine	M	6 ans	2	<i>Klebsiella</i>

		Abdallah el-bouni-Annaba-						pneumoniae
39	12-12-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	M	63ans	1,97	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
40	04-12-2014	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Néonatalogie	Urine	F	45ans	1,97	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
41	03-12-2013	Ibn Zohr-Guelma-	Pédiatre	Pus	F	15ans	2,04	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
42	04-11-2013	Ibn Zohr-Guelma-	Néonatalogie	Pus	F	39ans	1,82	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
43	12-10-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgicale Homme	Pus	M	55ans	1,95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
44	4-6-2014	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Médecine interne	Pus	F	33ans	2,12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
45	4-10-2014	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Urologie	Urine	M	56ans	2,14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
46	5-09-2014	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgicale Homme	Urine	M	30ans	2,07	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
47	22-03-2015	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgie générale	Urine	F	45jours	2,17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
48	20-04-2015	El-Hadjar-Annaba-	Traumatologie	Pus	F	60 ans	2,16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
49	03-01-2015	Abderrezak Bouhara Skikda	Traumatologie	Pus	M	26ans	2,15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
50	03-12-2013	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgie générale	Pus	F	31ans	1,91	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
51	04-02-2013	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgicale Homme	Urine	F	42ans	2,1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
52	03-03-2015	Abderrezak Bouhara Skikda	Pédiatre	Pus	M	33ans	2,01	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
53	04-03-2015	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Pédiatre	Urine	M	5 ans	2,15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
56	12-03-2015	Abderrezak Bouhara Skikda	Pédiatre	sang	F	3 ans	2,14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
58	06-01-2015	CHU Iben Sina Annaba	Brûlés	Pus	F	17 ans	2,02	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

F : féminin, M : masculin , EPH : Etablissement Public Hospitalier ,CHU : Centre Hospitalier Universitaire

Tableau N°19 : Caractérisation des souches *Escherichia coli* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF
1	8-5-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Pédiatre	Pus	M	14ans	1,97
2	20-06-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgicale Homme	Pus	M	32ans	1,99
3	8-05-2013	Ibn Zohr -Guelma-	Chirurgicale Homme	Pus	M	42 ans	2,06
4	20-10-2013	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Urine	F	34ans	1,83
5	5-6-2013	Ibn Zohr -Guelma-	Médecine interne	Urine	F	29ans	2
6	17-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	F	20jours	1,97
7	13-03-2012	Ibn Zohr -Guelma-	Médecine interne	Urine	F	35ans	2,03
8	8-5-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Chirurgie générale	Urine	F	28ans	1,98
9	8-5-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Néonatalogie	Pus	M	5jours	2,03
10	12-03-2015	Abderrezak Bouhara Skikda	Urologie	Urine	F	45ans	1,91
11	8-5-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Pédiatre	Pus	F	10ans	1,98
12	22-02-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	F	15jours	1,77
13	01-06-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgicale Homme	Pus	M	73ans	2
14	17-03-2017	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Traumatologie	Urine	F	31ans	1,87
15	03-06-2013	Ibn Zohr -Guelma-	Médecine interne	Urine	F	31ans	1,91
16	14-02-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Traumatologie	Pus	F	23ans	1,98
17	03-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Urine	F	23ans	1,87
18	11-01-2015	Abderrezak Bouhara Skikda	Urgence	Urine	F	75ans	1,87
19	19-05-2014	Ibn Zohr -Guelma-	Médecine interne	Urine	M	34ans	1,87
20	17-06-2014	El-Hadjar-	Bloc	Pus	M	71ans	1,95

		Annaba-					
21	27-01-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Urologie	Urine	F	53ans	2,08
22	26-10-2013	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Pus	F	21ans	1,87
23	30-10-2013	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Liquide plurale	F	22ans	1,84
24	03-06-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	M	13jours	2,03
25	30-11-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	F	26ans	1,99
26	28-04-2014	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Pus	F	31 ans	1,85
27	09-06-2013	Ibn Zohr -Guelma-	Médecine interne	Urine	F	49ans	2,08
28	15-06-2014	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgicale Homme	Pus	F	41ans	1,77
29	01-12-2014	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgicale femme	Urine	F	33ans	1,91
30	11-12-2014	El-Hadjar- Annaba-	Traumatologie	Pus	M	27ans	1,99
31	19-10-2013	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgicale Homme	Pus	M	36ans	1,77
32	14-05-2013	Ibn Zohr -Guelma-	Médecine interne	Urine	F	63ans	1,99
33	28-11-2014	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Pus	F	53ans	2,14
34	04-03-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Urine	F	32ans	1,73
35	17-03-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Néonatalogie	Pus	F	15 jours	2,01
36	23-12-2013	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgicale Homme	Pus	M	47ans	1,98
37	25-04-2015	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	F	71ans	1,79
38	15-12-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	F	45ans	2,09
39	8-5-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Chirurgie générale	Urine	F	27ans	2,08
40	5-10-2013	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgicale Homme	Urine	M	24ans	2,06
41	04-12-2013	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	pus	F	21ans	1,90
42	22-02-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Pus	F	19ans	2,18
43	22-03-2015	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Néonatalogie	Urine	M	1mois	2,05

44	24-03-2015	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Néonatalogie	Urine	M	2mois	1,99
45	15-08-2014	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgie générale	Pus	F	79ans	2,17
46	27-11-2013	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgie générale	Pus	F	39ans	2,09
47	28-06-2013	Ibn Zohr –Guelma-	Médecine	Pus	F	78ans	2,09
48	01-06-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgie générale	Pus	F	55 ans	2,09
49	20-10-2013	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgicale Homme	Urine	M	35ans	1,94
50	21-8-2013	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Urine	F	74ans	2,07
51	14-05-2013	Ibn Zohr –Guelma-	Médecine interne	Urine	F	30ans	2,21
52	28-05-2013	Ibn Zohr –Guelma-	Médecine	Urine	M	31ans	1,85
54	17-3-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Chirurgie générale	Urine	F	33ans	2,15
60	21-5-2013	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Urine	F	30ans	1,85

Tableau N°20 : Caractérisation des souches *Enterobacter spp.* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF	Espèce type
1	24-06-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Traumatologie	Urine	M	62ans	1,98	<i>E. cloacae</i>
2	04-03-2014	El-Hadjar- Annaba-	Urologie	Urine	F	28ans	1,72	<i>E. amnigenus</i>
3	17-07-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Pus	F	66ans	1,92	<i>E. cloacae</i>
4	8-05-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Chirurgicale Homme	Urine	M	36ans	2	<i>E. cloacae</i>
5	14-05-2013	Ibn Zohr – Guelma-	Médecine Interne	Urine	F	24ans	2	<i>E. cloacae</i>
6	18-07-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Urine	F	36 ans	1,9	<i>E. cloacae</i>
7	28-04-2014	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Pus	F	31ans	2,05	<i>E. cloacae</i>
8	25-12-0214	CHU Ibn Sina Annaba	Brûlés	Pus	F	43 ans	1,98	<i>E. ludwigii</i>
9	19-05-2013	Ibn Zohr – Guelma-	Médecine interne	Urine	F	77ans	2,02	<i>E.cloacae</i>
10	12-10-2014	El-Hadjar-	Traumatologie	Pus	M	79ans	2,1	<i>E. cloacae</i>

		Annaba-						
11	18-07-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgicale générale	pus	F	40ans	1,94	<i>E. cloacae</i>
12	10-07-2014	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Pus	F	45ans	1,92	<i>E. cloacae</i>
13	25-12-2014	CHU Ibn Sina Annaba	Brûlés	Pus	M	18ans	1,88	<i>E. cloacae</i>
14	25-12-2014	CHU Ibn Sina Annaba	Brûlés	Pus	F	11ans	1,96	<i>E. cloacae</i>
15	10-12-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	M	56ans	1,95	<i>E. Braakii</i>
16	11-02-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgicale Homme	Pus	M	27ans	2,12	<i>E. cloacae</i>
17	03-06-2013	Ibn Zohr – Guelma-	Bloc	Pus	F	35ans	1,98	<i>E. ludwigii</i>

Tableau N°21 : Caractérisation des souches *Proteus spp.* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélevement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélevement	Sexe	Age	Score MALDI TOF	Espèce type
1	03-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgie générale	Pus	F	22ans	1,98	<i>P. penneri</i>
2	28-04-2014	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Pus	F	32ans	2,02	<i>P. mirabilis</i>
3	03-12-2013	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	M	69 ans	2,05	<i>P. vulgaris</i>
4	28-04-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	F	28mois	2,07	<i>P. mirabilis</i>
5	24-04-2014	El-Hadjar- Annaba-	Traumatologie	Pus	M	31ans	2,03	<i>P. mirabilis</i>
6	10-03-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgie générale	Pus	F	45ans	2,15	<i>P. mirabilis</i>
7	1-01-2015	El-Hadjar- Annaba-	Traumatologie	Urine	F	43ans	2,07	<i>P. mirabilis</i>
8	03-03-2013	Nouaouria Abdallah el-bouni-Annaba-	Médecine interne	Urine	M	74ans	2,02	<i>P. mirabilis</i>
9	06-05-2014	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgie générale	Urine	F	33ans	2,14	<i>P. mirabilis</i>
10	03-10-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	F	44ans	2,10	<i>P. mirabilis</i>
11	11-03-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Urine	F	24ans	2,10	<i>P. mirabilis</i>
12	26-08-2013	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Pus	M	58ans	2,02	<i>P. mirabilis</i>

Tableau N°22 : Caractérisation des souches *Serratia spp.* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF	Espèce type
1	14-05-2013	Ibn Zohr – Guelma-	Médecine interne	Urine	F	28 ans	1,98	<i>S. marcescens</i>
2	26-08-2013	El-Hadjar- Annaba-	Chirurgie générale	Pus	F	26 ans	2,04	<i>S. marcescens</i>
3	03-03-2014	El-Hadjar- Annaba-	Traumatol ogie	Urine	F	88 ans	2	<i>S. marcescens</i>
4	4-07-2013	Ibn Zohr – Guelma-	Médecine interne	Pus	F	54 ans	2,01	<i>S. marcescens</i>
5	10-02-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Sang	M	36 ans	2,01	<i>S. marcescens</i>
6	04-03-2014	El-Hadjar- Annaba-	Médecine interne	Sang	F	32 ans	2,03	<i>S. marcescens</i>
7	03-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Pus	M	44 ans	2,09	<i>S. marcescens</i>
8	08-05-2013	Nouaouria Abdallah el- bouni-Annaba-	Chirurgie générale	Pus	F	39 ans	2,01	<i>S. ureilytica</i>
9	24-04-2014	El-Hadjar- Annaba-	Infectieux	Pus	F	39 ans	2,15	<i>S. marcescens</i>
10	04-09-2014	El-Hadjar- Annaba-	Bloc	Pus	M	64 ans	2,01	<i>S. marcescens</i>

Tableau N°23 : Caractérisation des souches *Morganella morganii* et leur score MALDI-TOF.

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF
1	26-11-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	M	85ans	2,12
2	03-11-2013	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgie générale	Urine	F	67ans	2,33
3	15-04-2014	El-Hadjar-Annaba-	Bloc	Pus	M	69 ans	2,17
4	15-12-2014	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	F	21ans	2,35
5	17-09-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Bloc	Pus	F	53ans	2,01
6	16-04-2014	El-Hadjar-Annaba-	Bloc	Pus	F	88ans	2,14
7	28-04-2014	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgie générale	PUS	F	39ans	1,99
10	03-09-2014	El-Hadjar-Annaba-	Bloc	Pus	F	80 ans	2

Tableau N°24 : Caractérisation des souches *Providencia spp.* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF	Spécie type
1	17-09-2014	El-Hadjar-Annaba-	Urgence	Pus	F	62ans	2,12	<i>P. rettgeri</i>
2	01-06-2014	Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgie générale	Pus	F	67ans	2,12	<i>P. rettgeri</i>
3	29-06-2014	El-Hadjar-Annaba-	Traumatologie	Pus	M	84 ans	2,13	<i>P. stuartii</i>

Tableau N°25 : Caractérisation des souches *Citrobacter spp.* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF	Spécie type
1	09-10-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Néonatalogie	Pus	M	15jours	1,93	<i>C. freundii</i>
2	01-12-2014	Ibn Sina Annaba	Brûlés	Pus	M	7mois	2	<i>C. braakii</i>

Tableau N°26 : Caractérisation des souches *Acinetobacter baumannii* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (EPH)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF
1	09-09-2014	El-Hadjar-Annaba-	Chirurgie générale	Pus	M	32ans	2,12
2	26-06-2013	Abderrezak Bouhara Skikda	Médecine interne	Liquide plurale	F	77ans	1,98
4	15-12-2014	El-Hadjar-Annaba-	Bloc	Pus	M	45ans	2,07
5	11-12-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	F	29ans	2,10
6	10-12-2013	El-Hadjar-Annaba-	Médecine interne	Pus	M	59 ans	2,01
7	19-03-2013	El-Hadjar-Annaba-	pédiatre	Pus	M	14ans	2,13
8	03/03/2014	El-Hadjar-Annaba-	Bloc	Pus	F	33ans	2,41

Tableau N°27 :Caractérisation des souches *Pseudomonas aeruginosa* et leur score MALDI-TOF

N souches	Date du prélèvement	Lieux (CHU)	Service	Type du prélèvement	Sexe	Age	Score MALDI TOF
1	2-12-2014	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	M	34ans	1,92
ALG-2	20-03-2014	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	F	23ans	2,01
3	06-01-2015	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	F	36ans	1,94
4	06-01-2015	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	M	34ans	2,02
5	06-01-2015	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	F	20ans	2,07
6	13-10-2014	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	F	56 ans	2,01
9	03-03-2013	EPH Nouaouria Abdallah el-bouni- Annaba-	Médecine interne	Urine	F	74ans	2,20
10	04-12-2013	EPH El-Hadjar- Annaba-	Traumatologie	Pus	F	33ans	1,98
11	23-12-2014	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	F	04ans	2,08
12	10-03-2014	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	M	20ans	2,13
13	20-10-2014	EPH Abderrezak Bouhara Skikda	Chirurgicale Homme	Pus	M	60ans	2,09
14	22-03-2015	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	M	33 ans	2,04
15	02-04-2013	EPH Ibn Zohr – Guelma-	Médecine interne	Pus	F	32 ans	1,78
16	26-10-2013	EPH Abderrezak Bouhara Skikda	Traumatologie	Pus	F	19ans	2,07
17	10-03-2014	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	F	33 ans	1,96
ALG-19	20-03-2015	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	M	34ans	2,07
20	24-02-2015	Ibn sina-Annaba	Chirurgicale Homme	Pus	F	24ans	2,05
23	24-04-2015	Ibn sina-Annaba	Brulés	Pus	F	17ans	2,07

ALG :Algérie

1.2. Répartition des souches selon la nature de prélèvement:

Nous avons noté que parmi les 186 BGN isolées le pus constituent le spécimen le plus répandu 61,29 %, suivit par les urines 35,48%, sang (2,15%) et liquide pleural (1,07 %) (Figure 16)

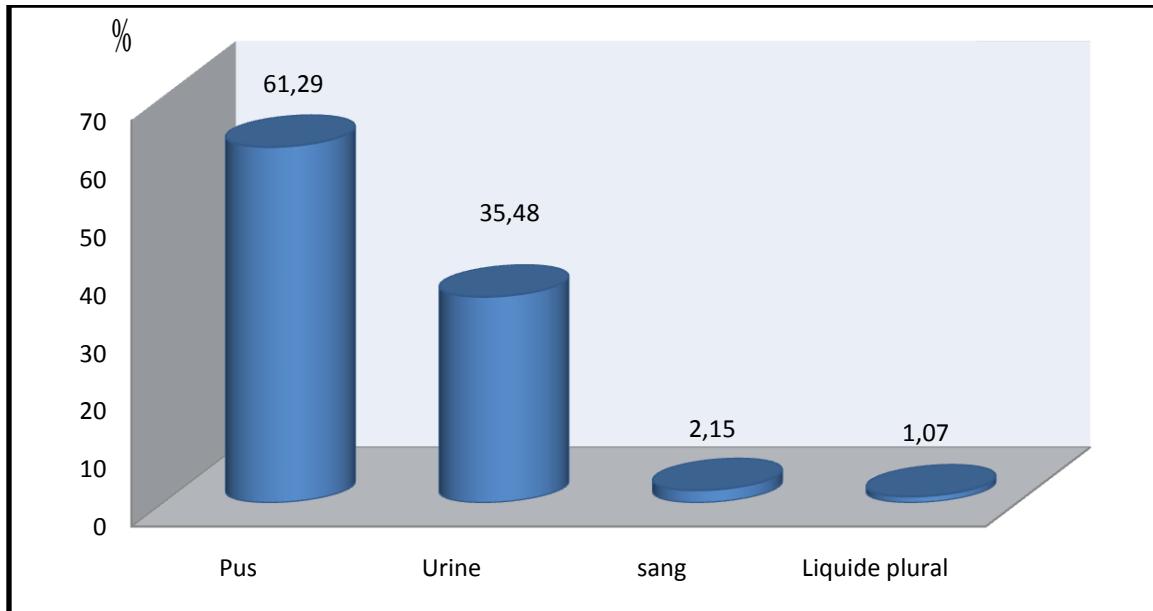


Figure N°16 : Répartition des souches par nature de prélèvements

1.3. Répartition des souches selon le service :

Nos souches ont été isolées dans différentes unités hospitalier (Médecine interne , Chirurgie générale, Pédiatrie, Urologie , Traumatologie, Bloc, Urgence, Néonatalogie, Burlés , Chirurgicale Homme, Chirurgicale Femme, infectieux), mais le service de medecine interne semble être le plus incriminé car 26 % des souches proviennent de ce service (Figure 17).

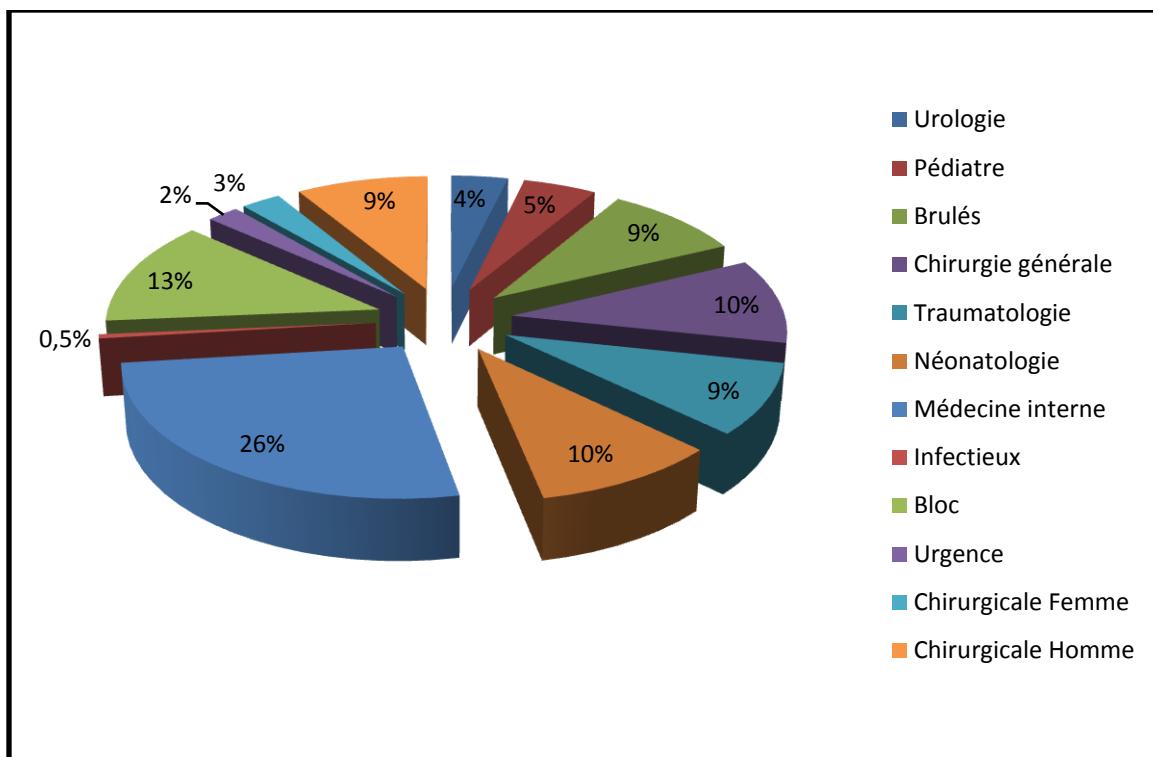


Figure N°17 : Répartition des espèces par services

1.4. Répartition des souches selon le sexe :

La population du laquelle nous avons isolé nos souches est caractérisée par une pourcentage de 63 % (117/186) des prélèvements qui sont issus de patients du sexe féminin contre 37 % (69/186) chez le sexe masculin. Cette répartition est illustrée par la figure ci dessous :

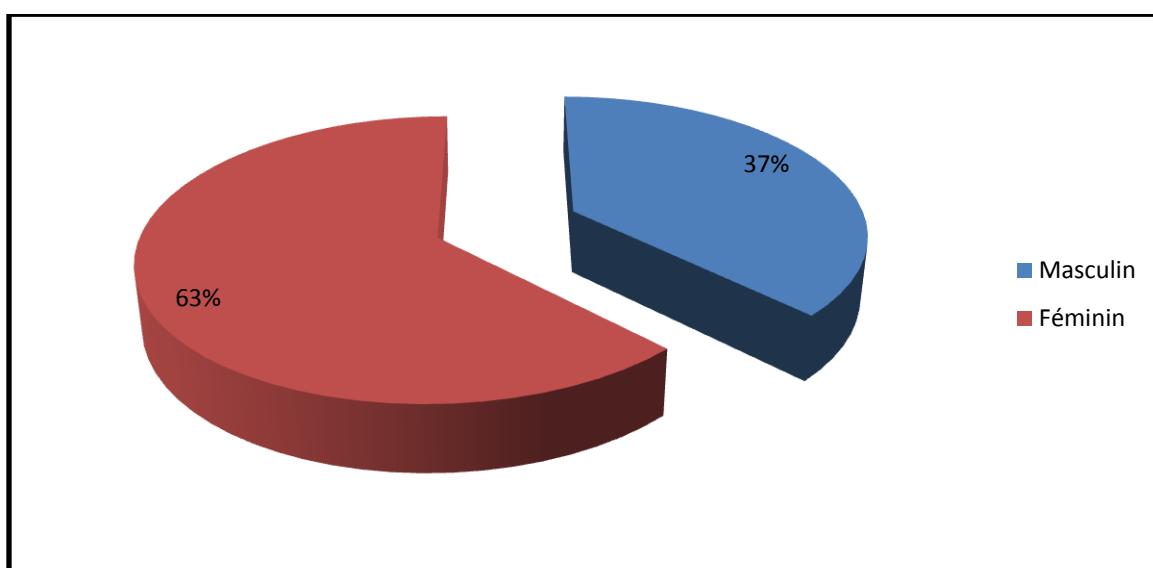


Figure N°18 : Répartition des espèces selon le sexe

1.5. Répartition des souches selon l'âge :

Toutes les tranches d'âges sont touchées par les infections à BGN, avec des extrêmes d'âge variant entre 5 jours et 88 ans. La tranche d'âge qui semble la plus touchée dans notre étude est la population des personnes âgées (18-50 ans : 58,60%) , suivie par la population de (>50 ans : 25%) (Figure 19).

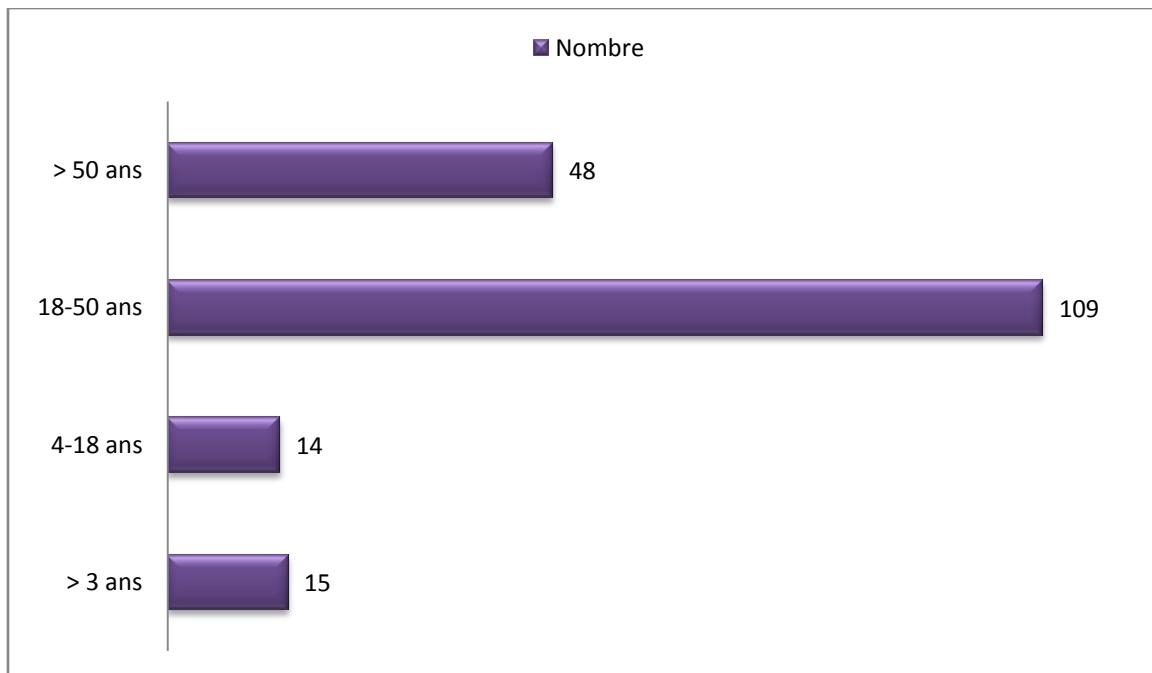


Figure N°19 : Répartition des espèces selon l'âge

2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

2.1. Antibiogramme par diffusion de disque sur un milieu gélosé :

✓ Entérobactéries :

Les souches des entérobactéries ont présenté un haut niveau de résistance aux β -lactamines principalement *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae* (phénotype de BLSE) et pourcentage moyen de résistance pour les autres Familles (Aminosides, Quinolones, Fosfomycine, et les autres antibiotiques) ,cependant aucune résistance n'a été détectée pour l'Imipénème et la Colistine (a l'exception de groupe *Proteus* spp. et *Serratia* spp. qui sont naturellement résistants à la colistine). (Tableau 28)(figure 20,21)

E. coli a présenté un taux élevé de résistance aux β -lactamines, 29 % des souches sont résistantes aux Cefoxitine et 38,1% sont résistantes aux C3G (Cefotaxime, Ceftriaxone) et Monobactame (Aztreonam), un faible pourcentage pour l'Ertapénème 12,7% (5 souches : *E. coli* N°24 ,N°25 N°51,N°60 et N°6),cependant aucune résistance n'a été détectée pour l'Imipénème et la Colistine. la résistance aux aminosides est représentée par 25% à la Gentamicine et 9% à l'Amikacine .On note que 27%, 63,6% , 56,3% des souches sont résistantes à la Ciprofloxacine, la Rifampycine et la Trimethoprime/ sulfamethoxazole respectivement.

Pour *Klebsiella spp.* la résistance reste élevée allant jusqu'à 80% à la Ceftriaxone, 75% pour Cefotaxime ,62,5% pour le Monobacteme (Aztreonam) , 20% sont résistantes aux l'Ertapénème (6 souches : *K. pneumoniae* N°24 , N°58, N°56, N°11, N°5 et N°10)(Figure 23), la résistance aux aminosides est en moyenne de 57,5 % pour la Gentamicine et 37,5% a l'Amikacine , a noter aussi un taux de résistance important aux Rifampycine 87,5% et 72,5% à la Trimethoprime/ sulfamethoxazole et 37% à la Ciprofloxacine. Aucune résistance n'a été observée *vis-à-vis* de la Colistine et l'Imipénème.

80% des *Enterobacter spp.* sont résistantes aux Cefoxitine ,40 % , 33,3% ,46,6 % et 6 % pour la Cefotaxime, Azteronam, Ceftriaxone et la Ciprofloxacine respectivement . 26,6% pour les aminosides et 46,6% a l'Ertapénème (7 souches : *Enterobacter cloacae* N°12, N°7 , N°6 , N°3, N°11 , N°1 et N°5)(Figure 24) , aucune souche n'a présenté une résistance à l'Imipénème et la Colistine .

Pour *Serratia spp.* a montré une résistance moyenne aux céphalosporine de 3^{ème} génération (33,3% pour Cefotaxime et Ceftriaxone et 44,4 % à l'Azteronam) . 22,2% à l'Ertapénème (2 souches : *Serratia marcescens* N°4 , N°8) , aucune souche n'a présenté une résistance à l'Imipénème et la Ciprofloxacine et aux aminosides.

Pour *Proteus spp.* 25% sont résistantes à la Cefoxitine et la Cefotriaxone, ,33,3% à la Cefotaxime, 8,3% à l'Aztreonem , l'Amikacie, Gentamicine et la Fosfomycine et 83,3% à la Trimethoprime/ sulfamethoxazole . Aucune résistance n'a été observée *vis à-vis* de l'imépénème ,l'Ertapénème ,la Colistine et la Ciprofloxacine.

Chez *Citrobacter spp.* la totalité des souches sont sensibles aux antibiotiques sauf 50% qui sont résistantes à la Cefotaxime et 100% à la Rifampycine.

Morganella morganii est presque sensible à tous les antibiotiques sauf 16,6% résistantes à la Cefotaxime et à la Trimethoprime/ sulfamethoxazole, 33,3% à la Ciprofloxacine et à la Fosfomycine.

66,6% des *Providencia spp* sont résistantes aux Cefotaxime, Ciprofloxacine, Fosfomycine et la Trimethoprime/ sulfamethoxazole , 33,3% à la Ceftriaxone , la Gentamicine et à la Rifampycine

✓ **Bacilles à Gram Négatif non fermentants :**

Pour *A. baumannii* et *P. aeruginosa* , on note que la totalité des souches montre des niveaux de résistances très élevés aux 11 antibiotiques testés particulièrement aux β-lactamines et 100 % des souches sont résistantes à l'Imipénème pour *Acinetobacter baumannii* (7 souches)(Figure 26) et 50% pour *Pseudomonas aeruginosa*(9 souches)(Figure 25) . Le phénotype probable de la résistance à cette molécule est la production des carbapénèmases. Aucune résistance n'a été observée *vis-à-vis* de la Colistine. (Tableau 28)

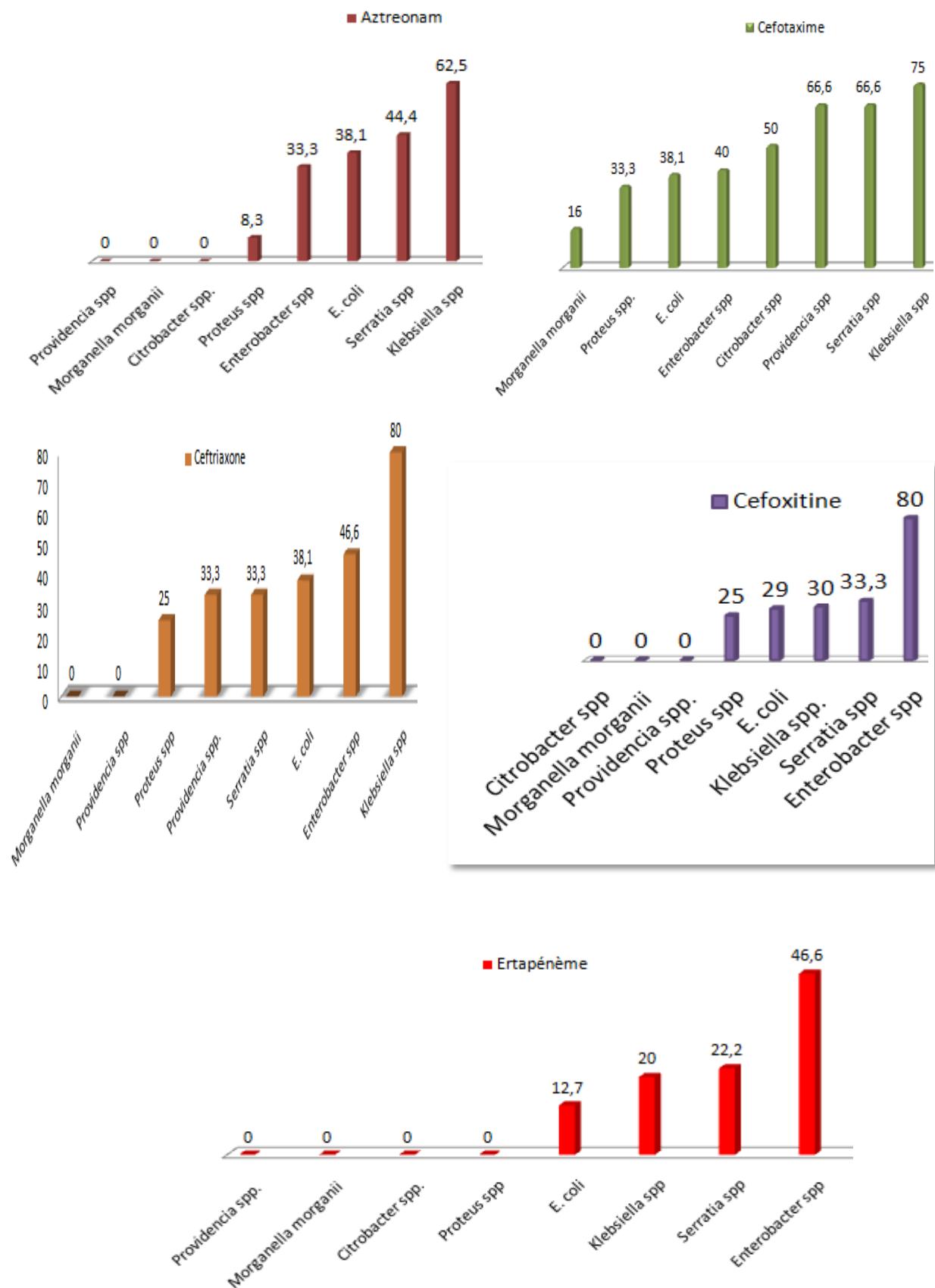


Figure N°20 : Pourcentage de la résistance des entérobactéries a la famille des *B*-lactamines

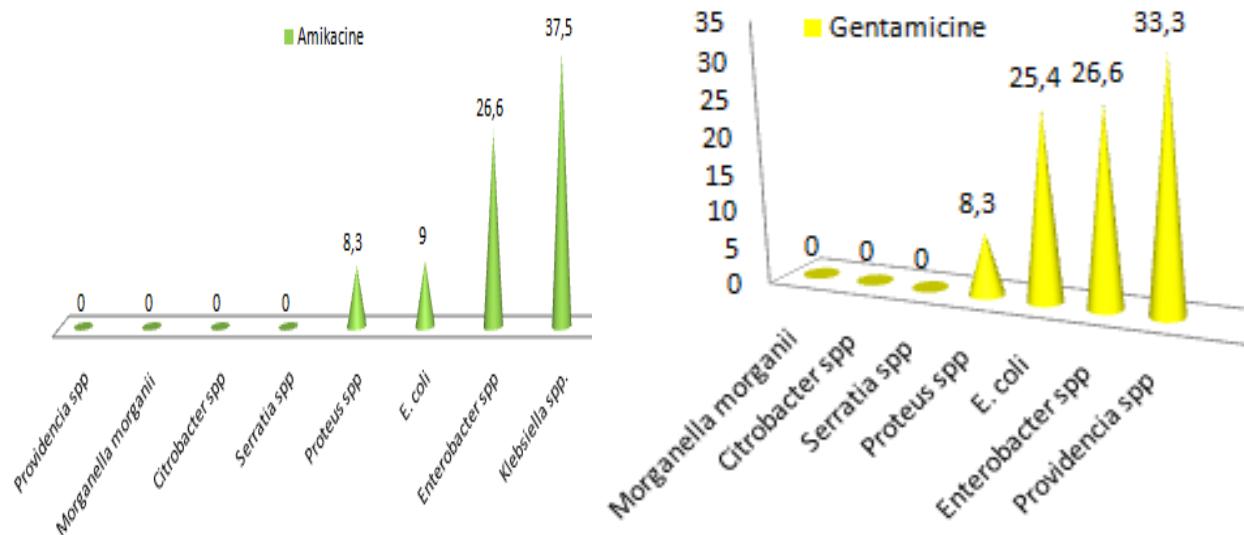


Figure N°21 : Pourcentage de la résistance des entérobactéries a la famille des aminosides

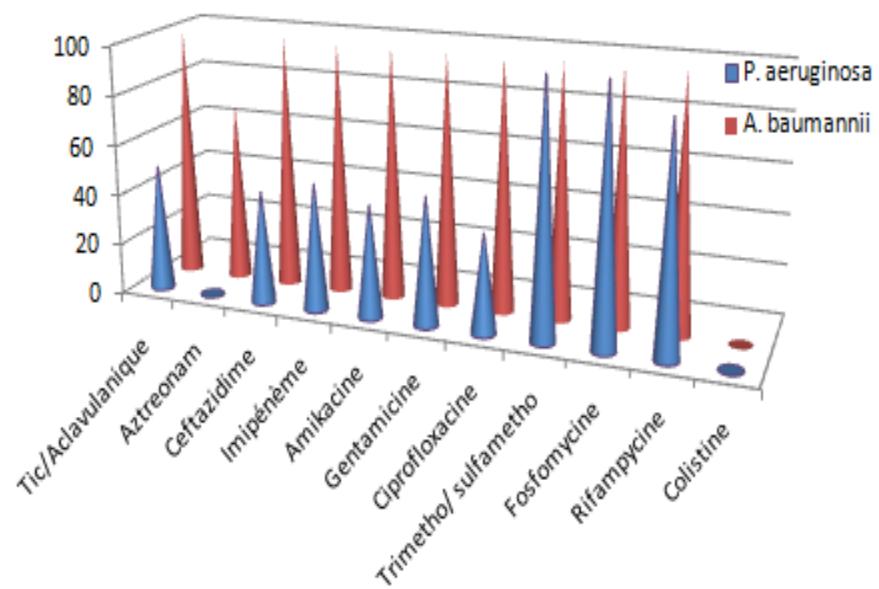


Figure N°22 : Pourcentage de la résistance des BGN non fermentants aux antibiotiques

Tableau N°28 : Profil de résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolées

Antibiotiques	Résistance (%)									
	Entérobactéries N=161									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amoxicilline	74,5	87,5	93,3	77,7	66,6	100	100	100	/	/
Amoxicilline/ Acide clavulanique	65,4	70	93,3	77,7	50	50	100	100	/	/
Ticarcilline/ Acide clavulanique	/	/	/	/	/	/	/	/	50	100
Cefoxitine	29	30	80	33,3	25	0	0	0	/	/
Cefotaxime	38,1	75	40	66,6	33,3	50	16,6	66,6	/	/
Aztreonam	38,1	62,5	33,3	44,4	8,3	0	0	0	33,3	71,8
Ceftriaxone	38,1	80	46,6	33,3	25	0	0	33,3	/	/
Ceftazidime	/	/	/	/	/	/	/	/	44,4	100
Imipénème	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100
Ertapénème	12,7	20	46,6	22,2	0	0	0	0	/	/
Amikacine	9	37,5	26,6	0	8,3	0	0	0	44,4	100
Gentamicine	25,4	57,5	26,6	0	8,3	0	0	33,3	50	100
Ciprofloxacine	27,2	37,5	6,6	0	0	0	33,3	66,6	38,8	100
Trimethoprime/ sulfamethoxazole	56,3	72,5	26,6	22,2	83,3	0	16,6	66,6	100	100
Fosfomycine	0	52,5	26,6	11,1	8,3	0	33,3	66,6	100	100
Rifampycine	63,6	87,5	93,3	44,4	25	100	0	33,3	88,9	100
Colistine	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0

1 : *E. coli*, 2 : *Klebsiella spp.*, 3 : *Enterobacter spp.*, 4 : *Serratia spp.*, 5 : *Proteus spp.*,

6 : *Citrobacter spp.*, 7 : *Morganella morganii* , 8 :*Providencia spp.* 9 : *P. aeruginosa*,

10 : *A. baumannii*



Figure N°23 : Antibiogramme de *K. pneumoniae* N° 24 résistante à L'Ertapénème et posséder le gène *bla_{OXA-48}*



Figure N°24 : Antibiogramme des *Enterobacter cloacae* N°12 résistante à L'Ertapénème.

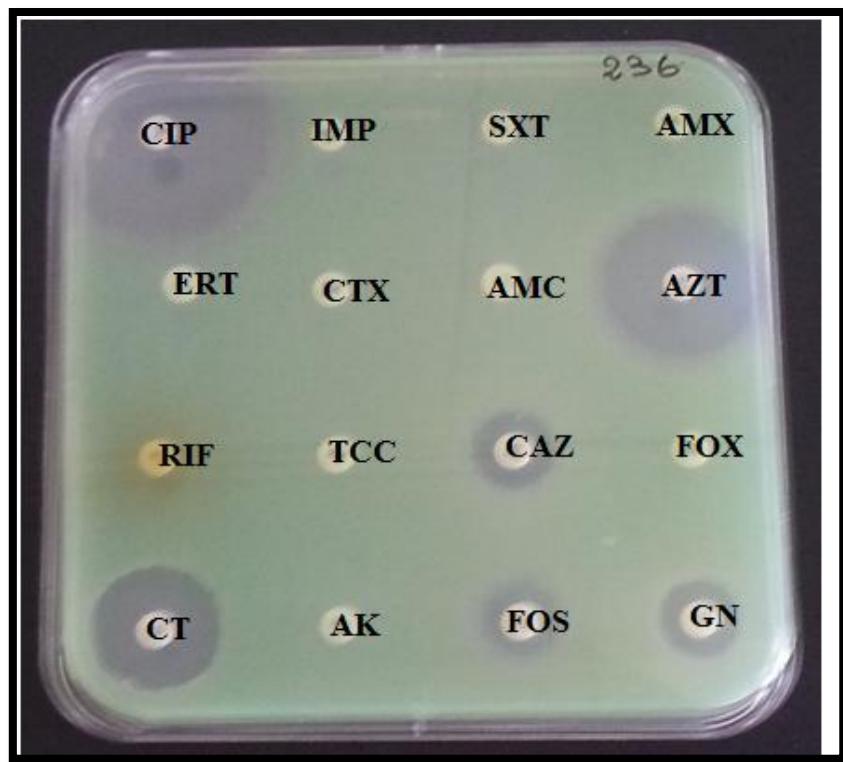


Figure N°25 : Antibiogramme de *P. aeruginosa* ALG-2 résistante à l'Imipénème et possèdent le gène *bla_{VIM-4}*

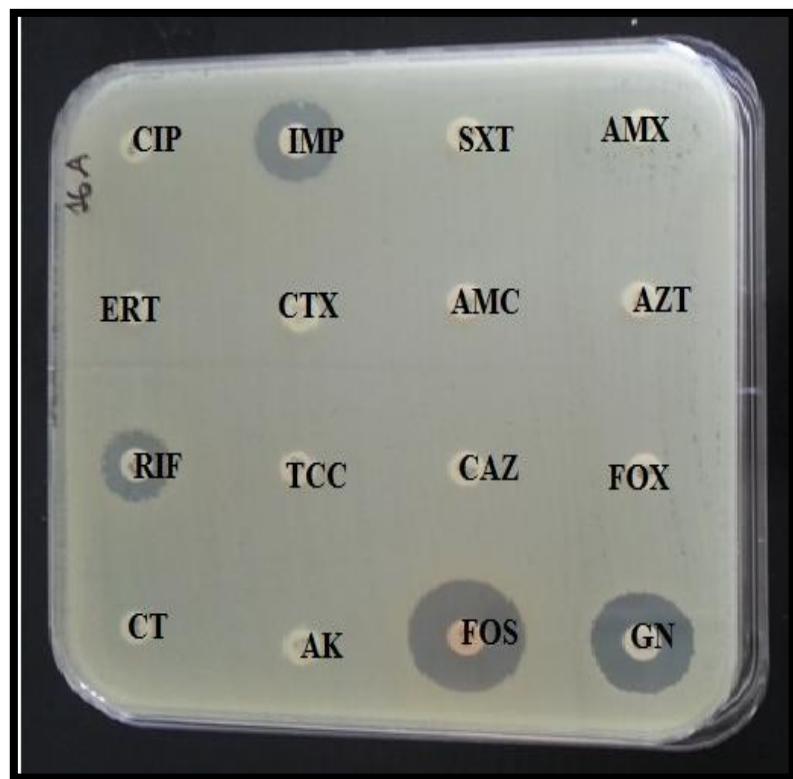


Figure N°26 : Antibiogramme de *A. baumannii* N°2 résistante à l'Imipénème et possèdent le gène *bla_{NDM-1}*

2.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test :

Les résultats de la CMI des 20 souches des entérobactéries résistantes à l'Ertapénème , étaient $> 32 \text{ mg/l}$ (Figure 27) pour 2 souches de *K. pneumoniae* N° 24 et N° 58

Pour les 100 % des *A. baumannii* et 50 % des *P. aeruginosa* résistantes à l'Imipénème ont présenté des valeurs très élevées de CMI $\geq 32 \text{ mg/l}$ pour l'Imipénème (Figure 28).

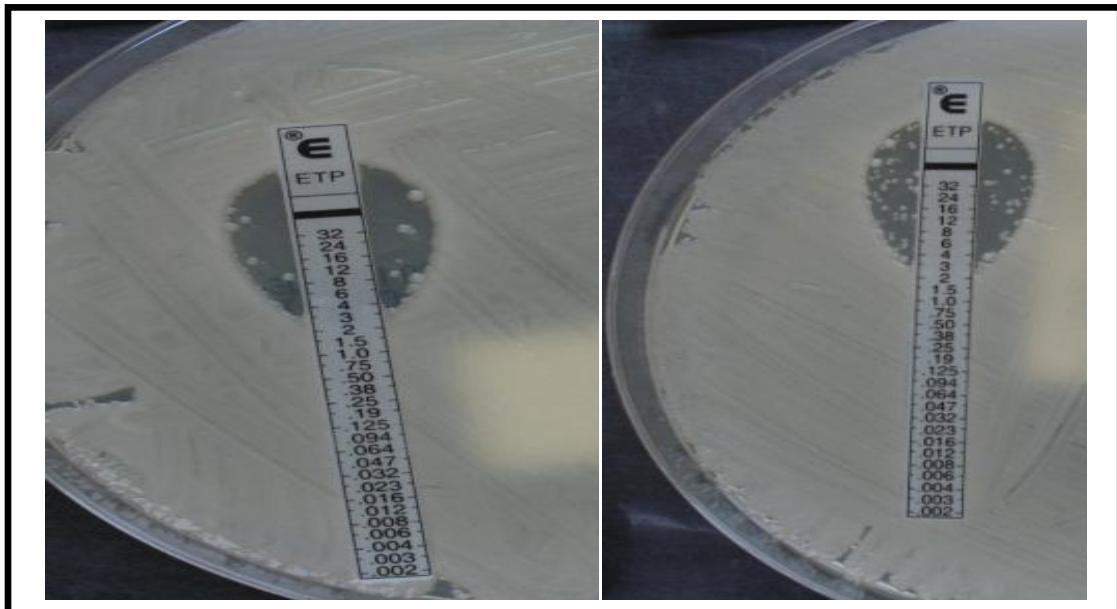


Figure N°27 : CMI par Etest Ertapénème

(A droite : *K. pneumoniae* N° 24 , à gauche : *K. pneumoniae* N° 58)

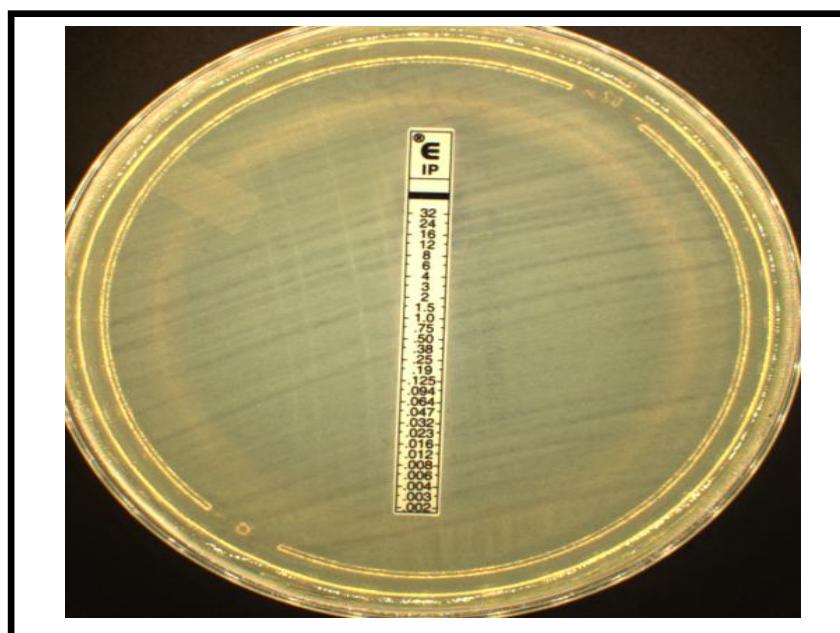


Figure N°28 : CMI par Etest Imipénème

3. Recherche phénotypique de la résistance aux antibiotiques :

3.1. Recherche phénotypique des β -lactamases :

3.1.1. Recherche phénotypique des BLSE :

✓ **Test de synergie:**

Le test de synergie a révélé la présence d'une image de synergie (bouchon de champagne ou entonnoir) entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique (pour 70 souches sur 186 (70 entérobactéries : 30 *Klebsiella spp.*, 20 *Escherichia coli* ,6 *Enterobacter spp.* , 4 *Proteus spp.*, 6 *Serratia spp.*, 1 *Morganella morganii* , 2 *Providencia spp.* , 1 *Citrobacter spp.*)(Figure 29) . Pour les souches d'*A. baumannii* et *P. aeruginosa* aucune image de synergie n'a été observée.

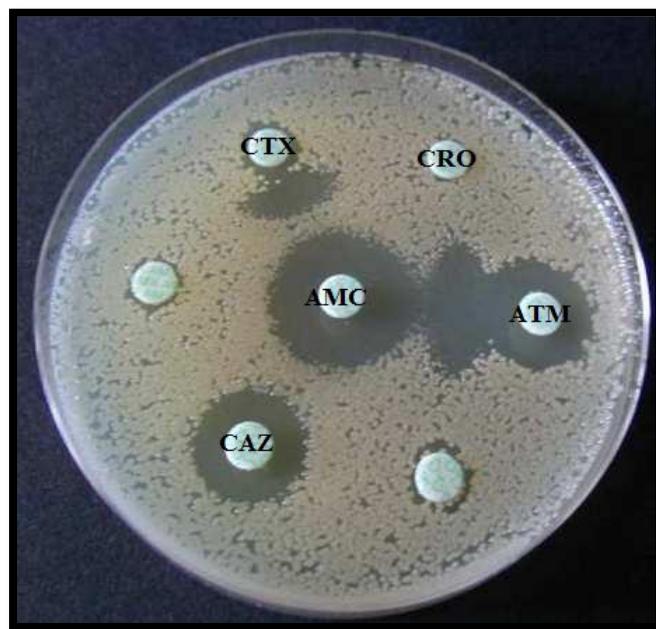


Figure N°29 : Test de synergie pour *K. pneumoniae* N° 24

✓ **Test de double disque**

Ce test est lancé pour les souches qui ne présentent pas une image de synergie, avec diminution des diamètres des céphalosporines de 3ème génération , pour confirmer la production d'une BLSE qui peut être masquée par un autre mécanisme.

5 souches d'*A. baumannii* N (1,4,5,6,8) ont montré un résultat positif parmi les 80 souches testées. (Figure 30)

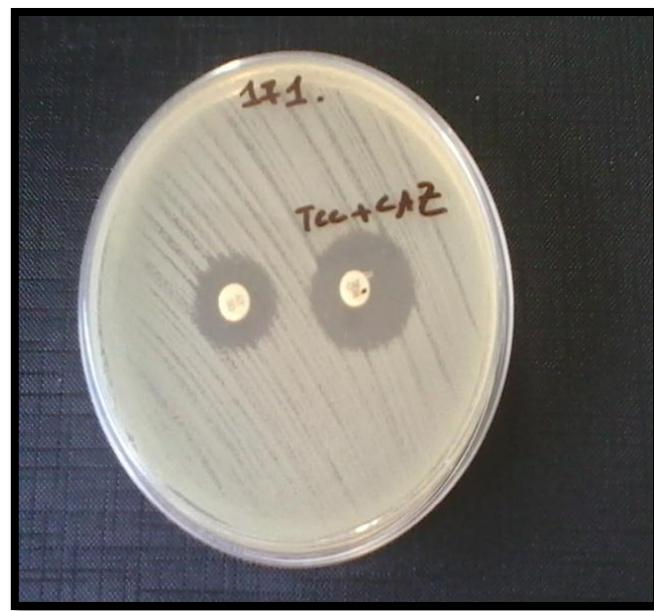


Figure N°30 : Test de double disque pour *A. baumannii* N°1

3.2. Recherche Phénotypique des carbapénèmases :

✓ Carba NP test modifié : (MCNP)

Pour les entérobactéries, le résultat de l'antibiogramme a révélé la présence de 20 souches résistantes à l'Ertapénème 12,4% (5 *E. coli*, 6 *K. pneumoniae*, 7 *E. cloacae*, 2 *S. marcescens*) , parmi ces souches 2 *Klebsiella pneumoniae* ont montré un résultat positif pour ce test (*Klebsiella pneumoniae* N°24 et N°58)) parce que l'hydrolyse des carbapénèmases acidifie le milieu ce qui provoque un changement de couleur de l'indicateur de pH de rouge vers le jaune indiquant de manière précise la présence d'une résistance aux carbapénèmases de type enzymatique(Figure 31), les autres souches ont montré des résultats non interprétables (le virage de milieu vers le jaune pour les deux tubes)(Figure 33)

Parmi les 50 % des *P. aeruginosa* (9 souches) résistantes à l'Imipénème , les résultats ont révélé la présence de 2 souches productrices de carbapénèmase (*P. aeruginosa* ALG- 2 et *P. aeruginosa* ALG-19 .(figure 32).

Pour *A. baumannii* toutes les souches résistantes à l'Imipénème (7 souches) étaient positives pour ce test. (Figure 32)

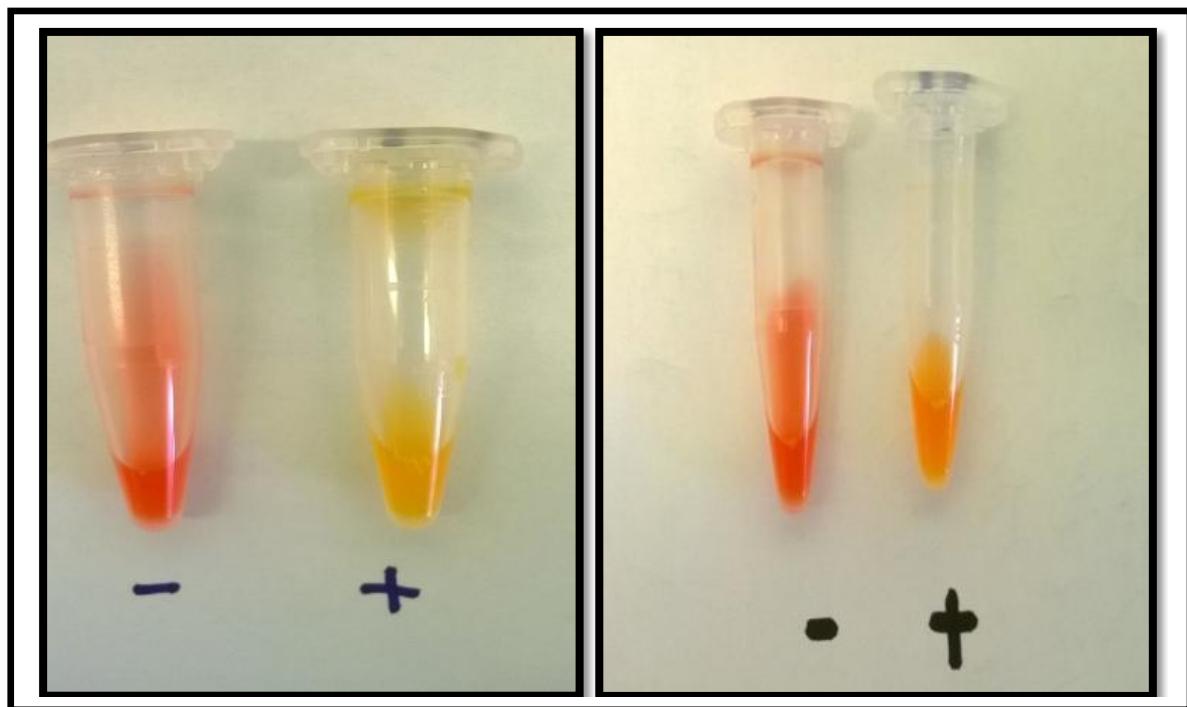


Figure N°31 : Résultat positif pour le test Carba NP pour *Klebsiella pneumoniae*

(A droite : *K. pneumoniae* N° 24 , à gauche : *K. pneumoniae* N° 58)

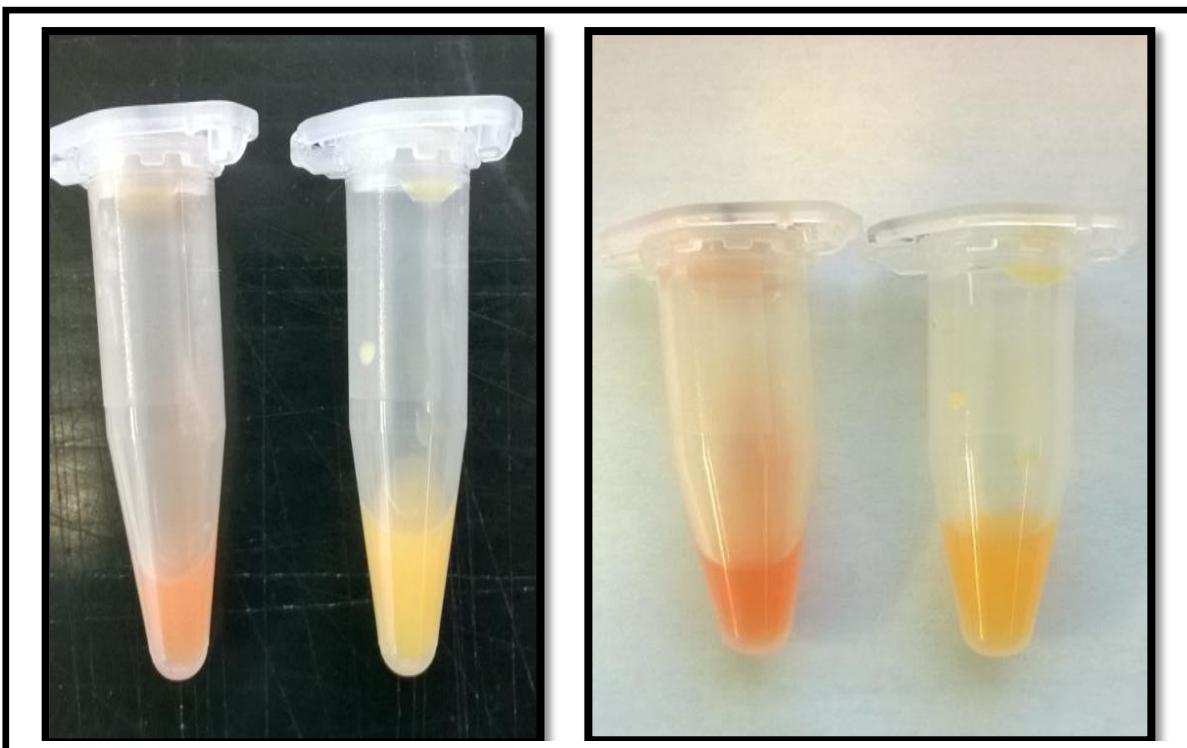


Figure N°32 : Résultat positif pour le test Carba NP pour les BGN

(A droite : *P. aeruginosa* ALG- 2 , à gauche : *A. baumannii* N °7)

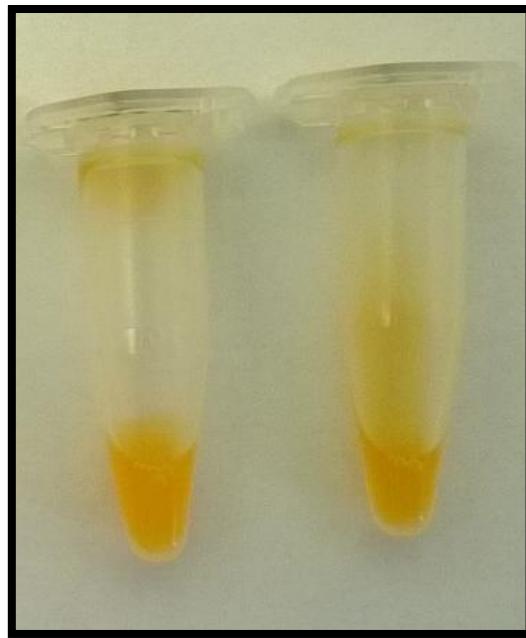


Figure N°33 : Résultat non interprétable pour *Serratia marcescens* N°4

✓ **Test de Hodge modifié : (MHT)**

Parmi les 161 souches des entérobactéries qui ont été isolées, 20 souches sont résistantes à l'Ertapénème et 6 souches sont positives au test de Hodge:

(*E. cloacae* N°12 et N°6 , *K. pneumoniae* N°24 , N°58 et N°5, *S. marcescens* N°8) (Figure 34,35). Le test de Hodge est positif lorsque la déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*Escherichia coli* ATCC 25922 indique la présence d'une carbapénémase .

Sur un total de 25 souches des bacilles à Gram négatif non fermentants , 16 souches (9 *P. aeruginosa* et 7 *A. baumannii*) ont été retrouvées résistantes à l'imipénème avec des CMIs \geq 32 μ g / ml, 9 souches (2 *P. aeruginosa* : *P. aeruginosa* ALG-2 et *P. aeruginosa* ALG-19 et 7 *A. baumannii*) ont montré des résultats positif au test de Hodge ce qui suggère une production de carbapénémase (Figure 36)

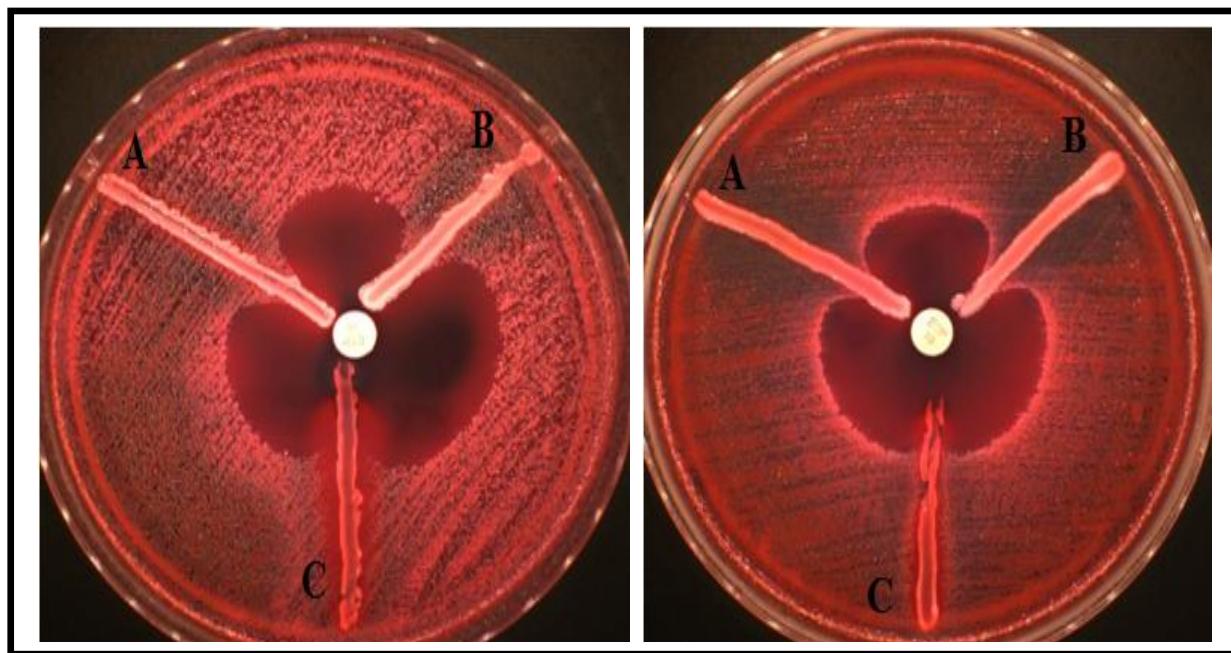


Figure N°34 : Test de Hodge positif pour *K. pneumoniae* N°24 et N°58

A : Témoin positif (*Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase), B : souche testée, C : Témoin négatif (*Klebsiella pneumoniae* non productrice de carbapénémase)

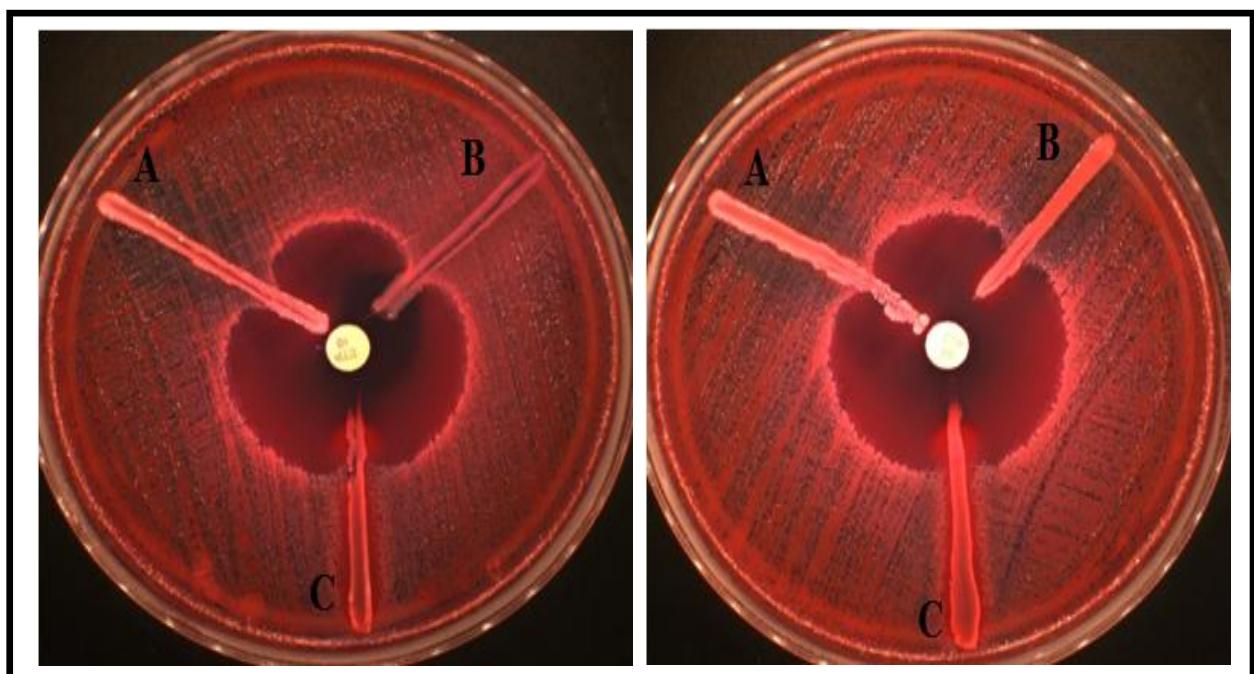


Figure N°35 : Test de Hodge positif pour *E. cloacae* N°12 et N°6.

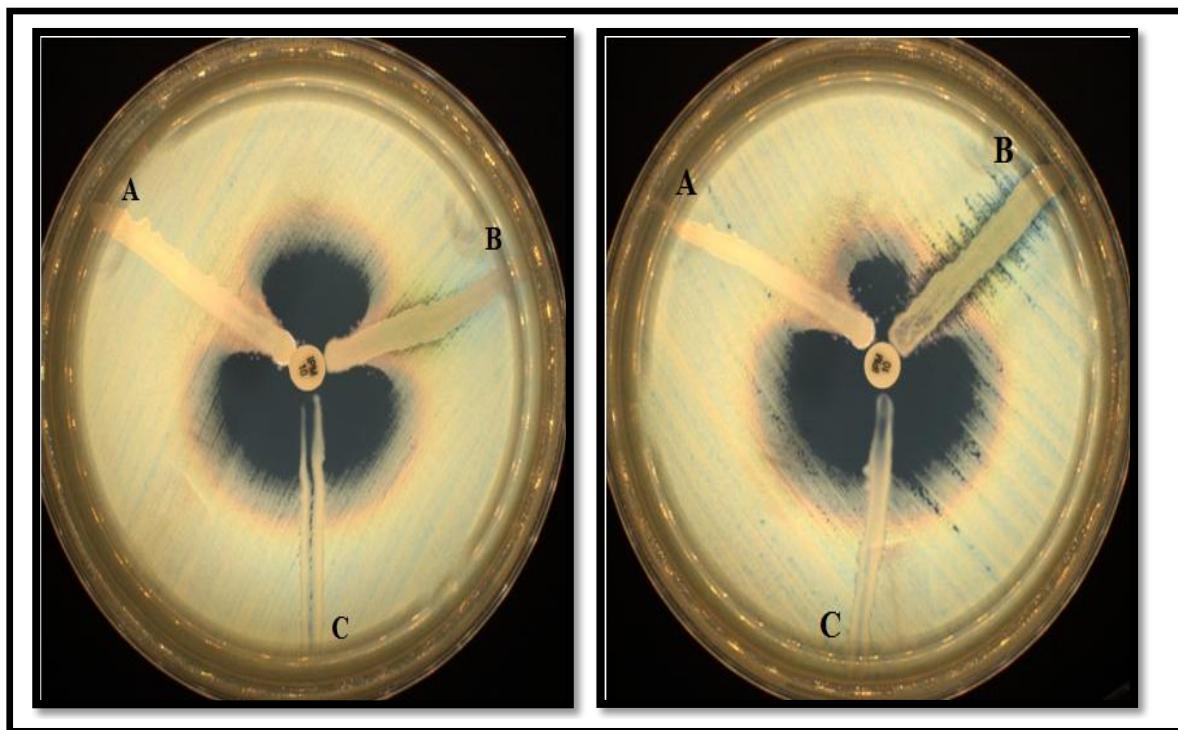


Figure N°36: Test de Hodge positif pour *P. aeruginosa* ALG- 19 et *A. baumannii* N°2

✓ **Test de l'EDTA :**

Les résultats des EDTA ont montré que parmi les 16 souches des bacilles à Gram négatif non fermentants résistantes à l'Imipénème, 4 souches ont révélé la présence de carbapénèmases de la classe B d'Ambler (métallo-β-lactamases) (*P. aeruginosa* ALG- 2 et *P. aeruginosa* ALG-19 et *A. baumannii* N°2 et *A. baumannii* N°7) par :

- **Méthode EDTA-disque synergie** : on observe chez les 4 souches une synergie entre les deux disques. (Figure 37, 38, 39).
- **Méthode des disques combinés** : on remarque que le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul pour les 4 souches (au moins 6mm) (Figure 37,38, 39)

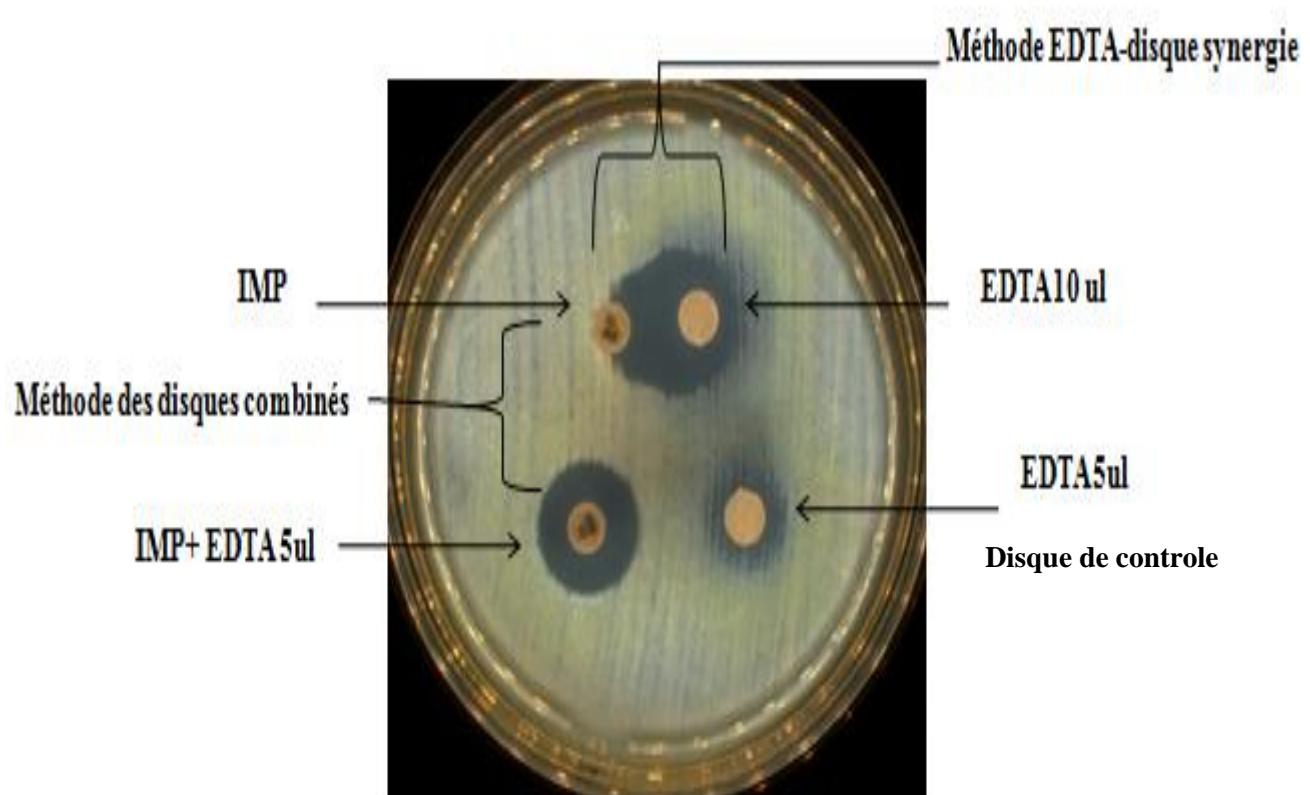


Figure N°37: Test de l'EDTA pour *P. aeruginosa* ALG- 2

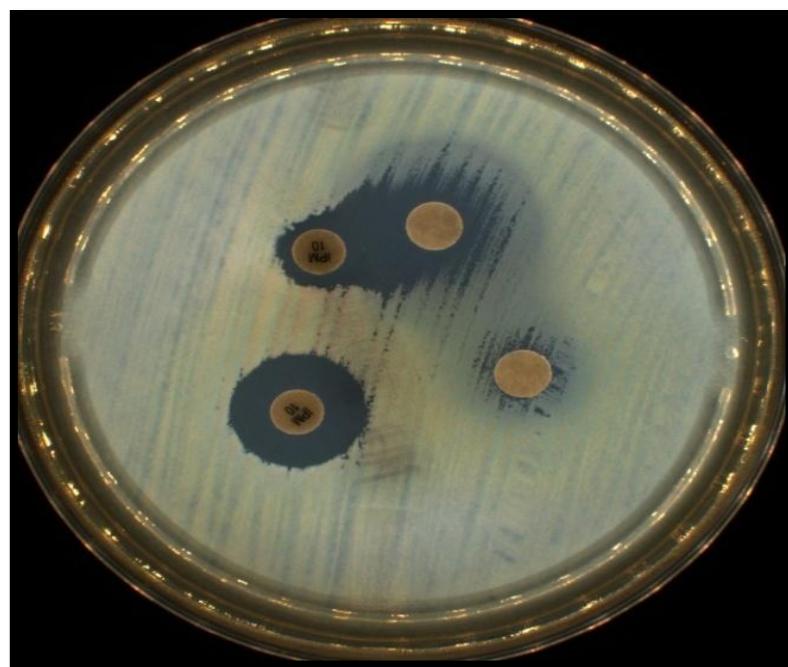


Figure N°38: Test de l'EDTA pour *P. aeruginosa* ALG- 19

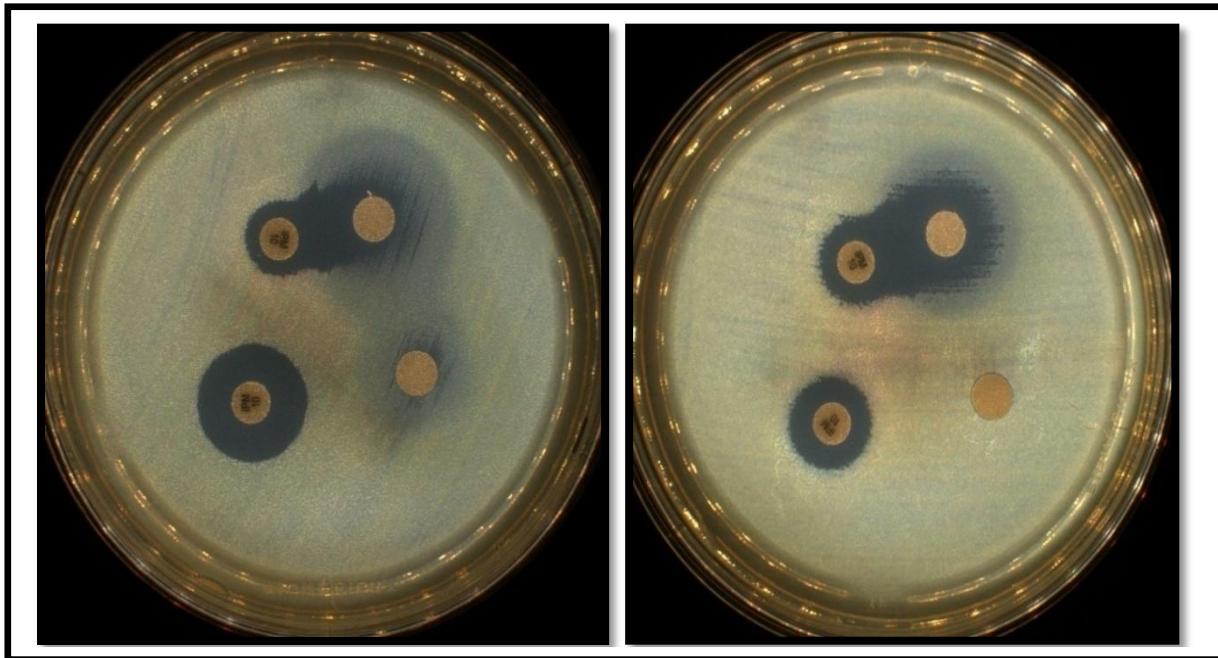


Figure N°39 : Test de l'EDTA pour *A. baumannii* N°2 et *A. baumannii* N°7

4. Recherche moléculaire des gènes de résistance :

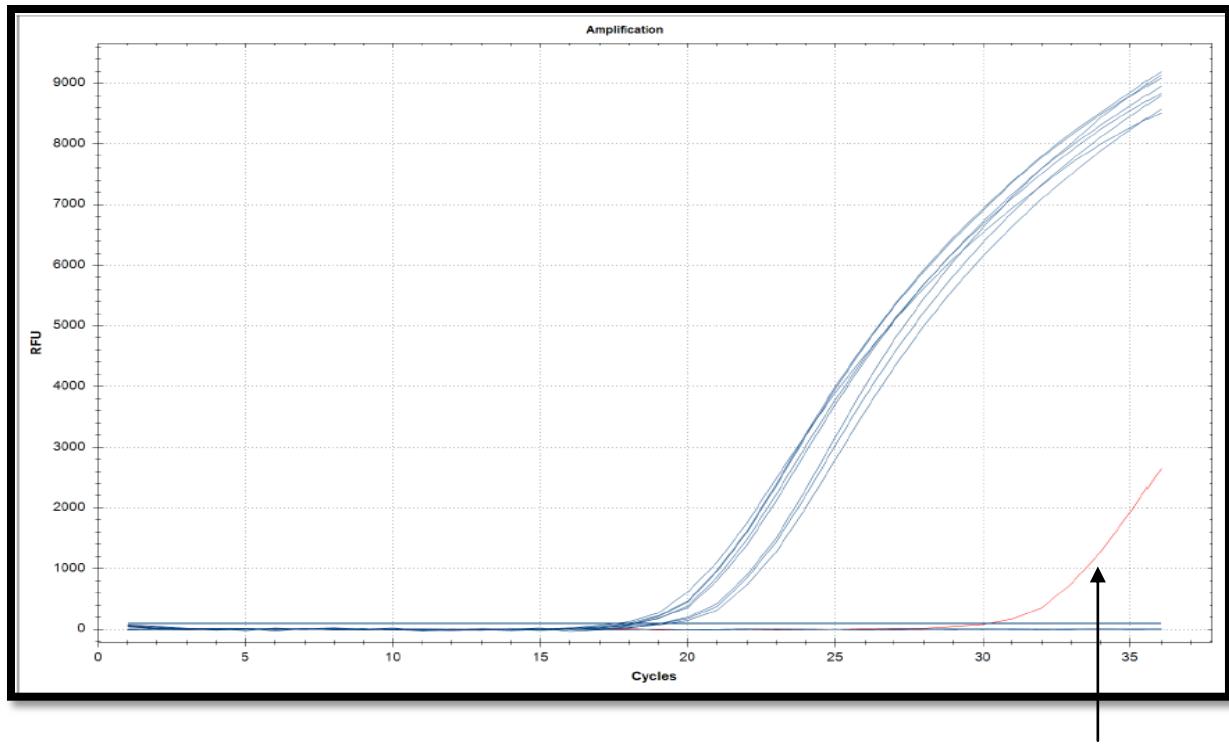
Concernant l'étude moléculaire, seulement les souches résistantes à l'Imipénème et à l'Ertapénème sont étudiées : (20 entérobactéries : *E. cloacae* N°(12,7,3,6,11,1,5) , *K. pneumoniae* N°(24,58,56,11,05,10) , *E.coli* N°(24,25,51,60,6) , *Serratia marcescens* N°(4,8). et *P. aeruginosa* N°(1, ALG-2,3,4,5,11, ALG-19,20,23) et les 7 souches d'*A. baumannii*.

4.1. Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre étendu :

✓ PCR en temps réel :

Le résultat de la PCR en temps réel pour les amorces qui codent pour les BLSE de type *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTXM}* montre que pour les entérobactéries , ont été avérées productrices d'au moins un seul gènes qui codent pour le BLSE (Figure 40, 41, 42) .

Seule le gène *bla_{TEM}*, a été détecté pour *A. baumannii* (Figure 43) , pour *P. aeruginosa* aucune souche ne possède les gènes de type BLSE.



Contrôle positif

Figure N°40 : PCR en temps réel du gène *bla*_{CTX-M} des 20 entérobactéries

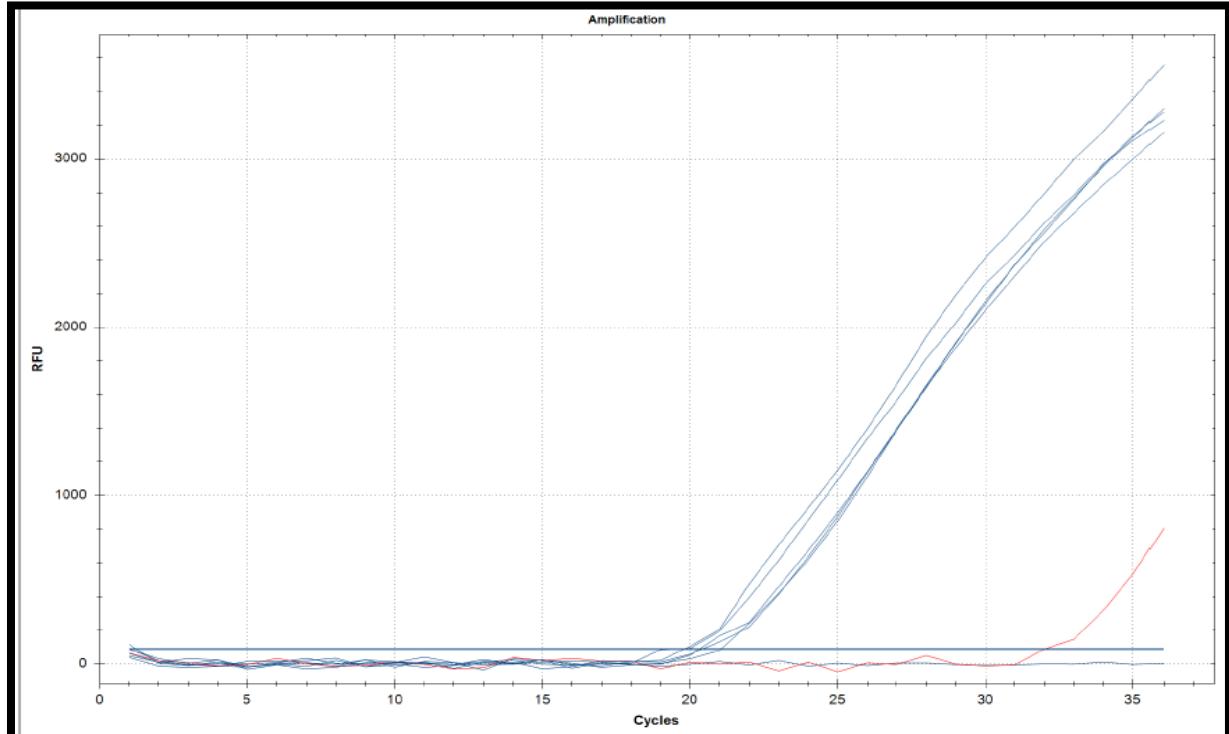


Figure N°41 : PCR en temps réel du gène *bla*_{TEM} des 20 entérobactéries

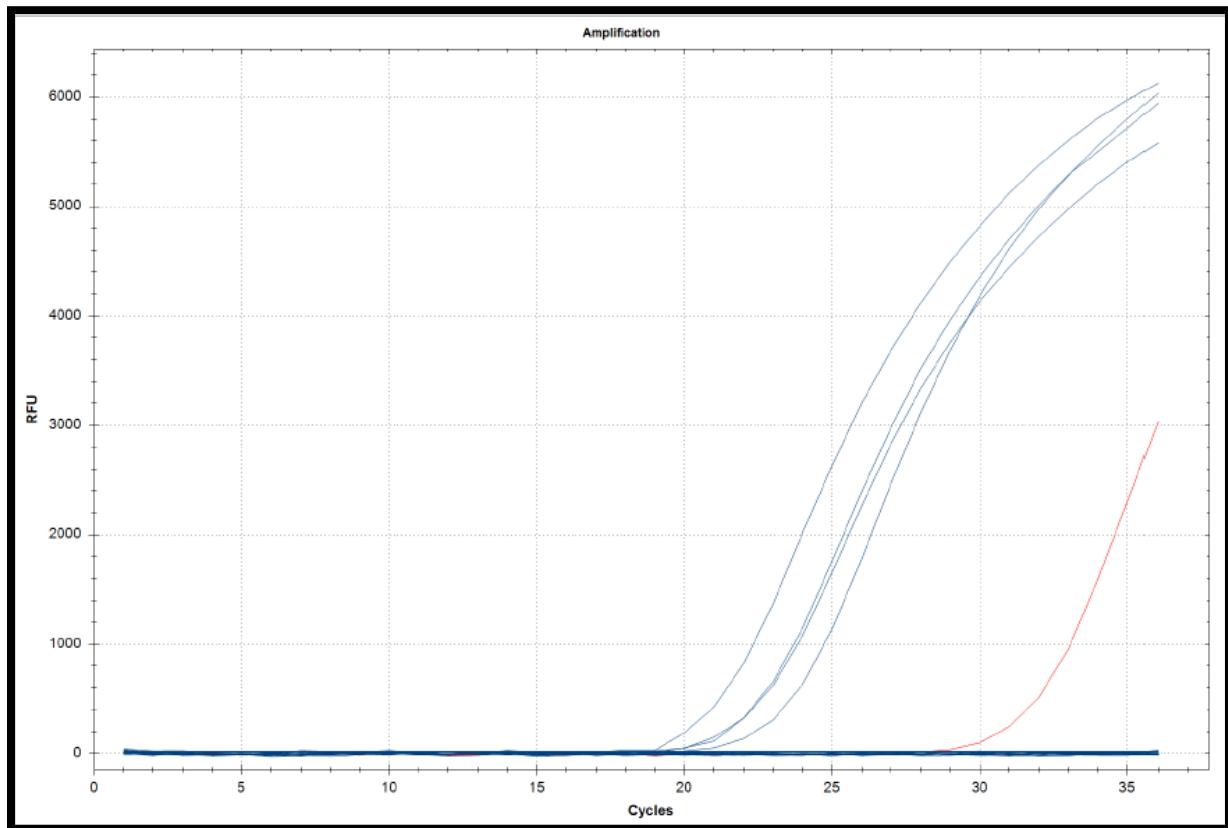


Figure N°42 : PCR en temps réel du gène *blaSHV* des 20 entérobactéries

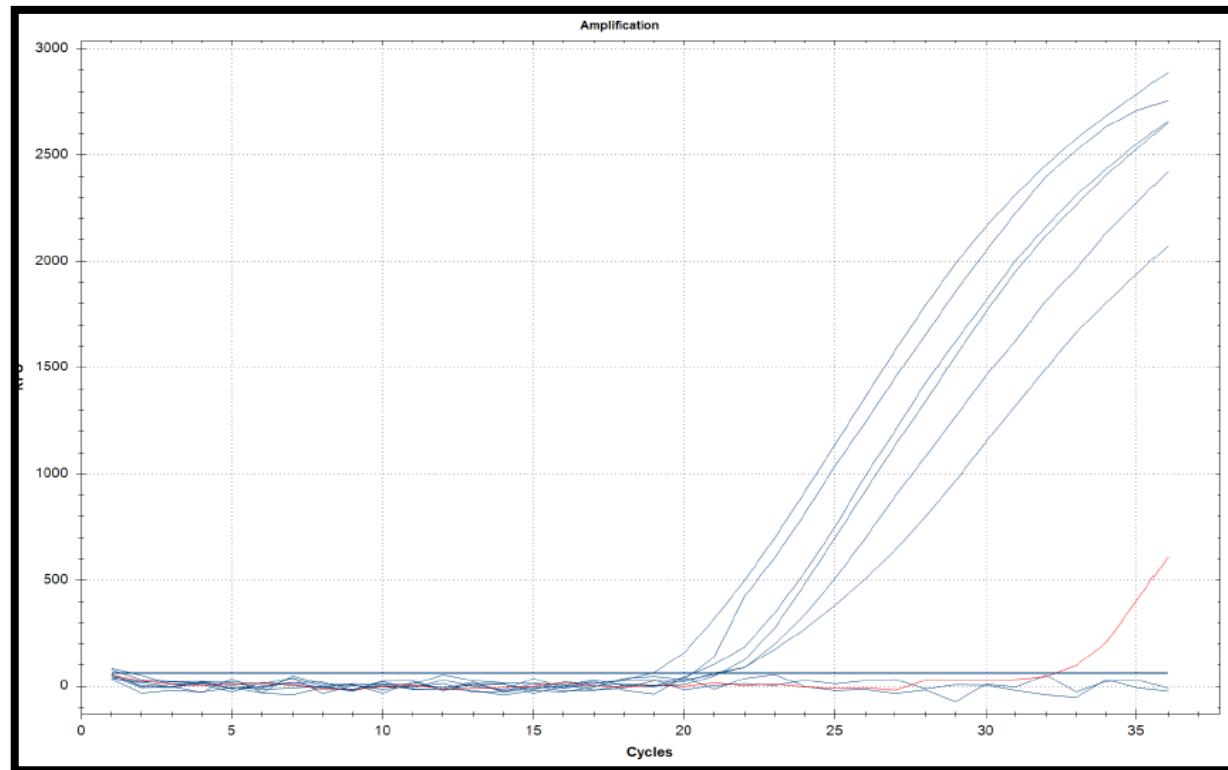


Figure N°43 : PCR en temps réel du gène *blaTEM* des *A. baumannii*

✓ PCR standard :

Tous les résultats de PCR en temps réel ont été confirmés par la PCR standard , cette dernière reste une technique plus efficace :

Sur 20 Entérobactéries :

- 18 souches sont porteuses du gène *bla*_{CTX-M} : *E. cloacae* N°(12,3,6,11,1,5) , *K. pneumoniae* N°(24,58,56,11,05,10) , *E.coli* N°(24,51,60,6) , *S. marcescens* N°(4,8)(Figure 44).
 - 9 souches sont porteuses du *bla*_{TEM} : *E. cloacae* N°(3,6,11,1) , *K. pneumoniae* N°(11,05,10) , *E.coli* N°(60,25)(Figure 45)
 - 4 souches sont porteuses du *bla*_{SHV} : *K. pneumoniae* N°(24,58, 11,05)(Figure 46).
- (Annexe 3)

Le seul gène codant pour les β-lactamases chez les souches d'*A. baumannii* est le *bla*_{TEM} détecté chez cinq souches d'*A. baumannii* N°(1,4,5,6,8)(Figure 47) (Annexe 4)

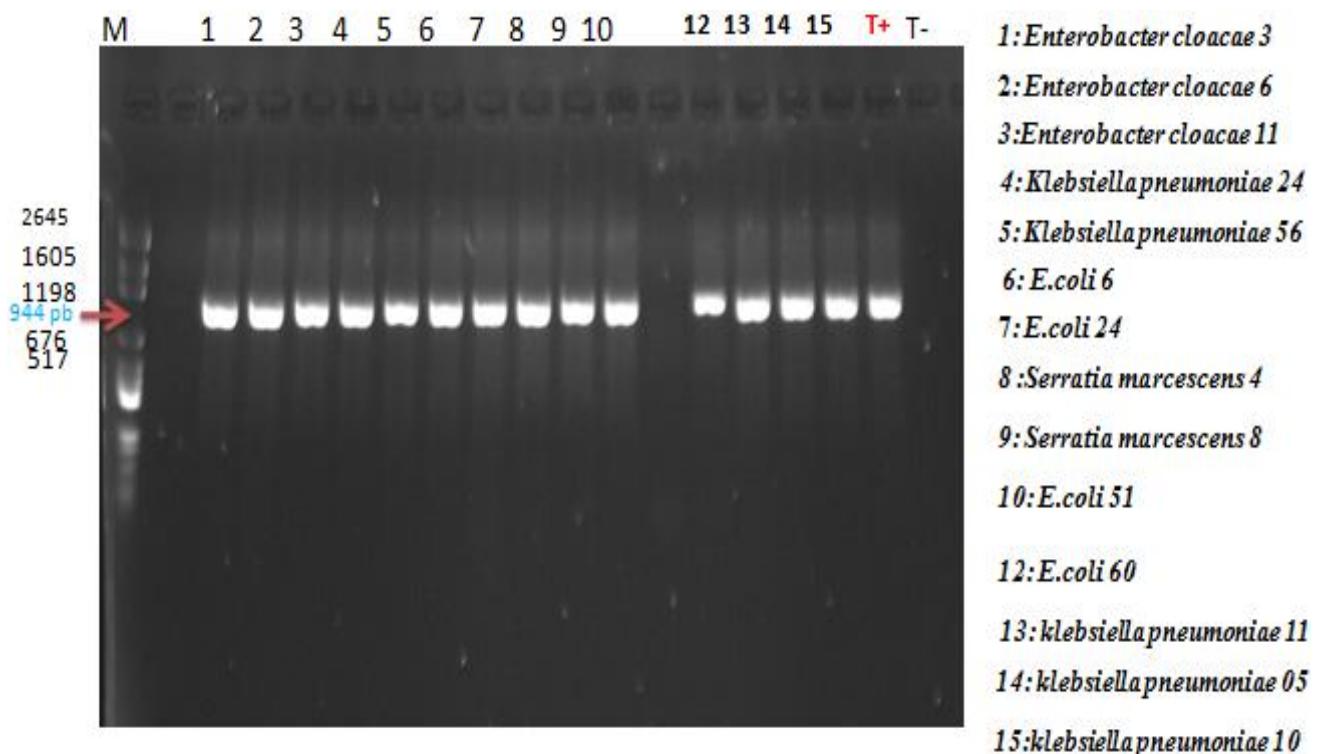


Figure N°44: Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *bla*_{CTX-M} pour les entérobactéries

M : Marqueur de taille, T⁺ : Témoin positif, T⁻ : Témoin négatif, Pb : Paire de bases.

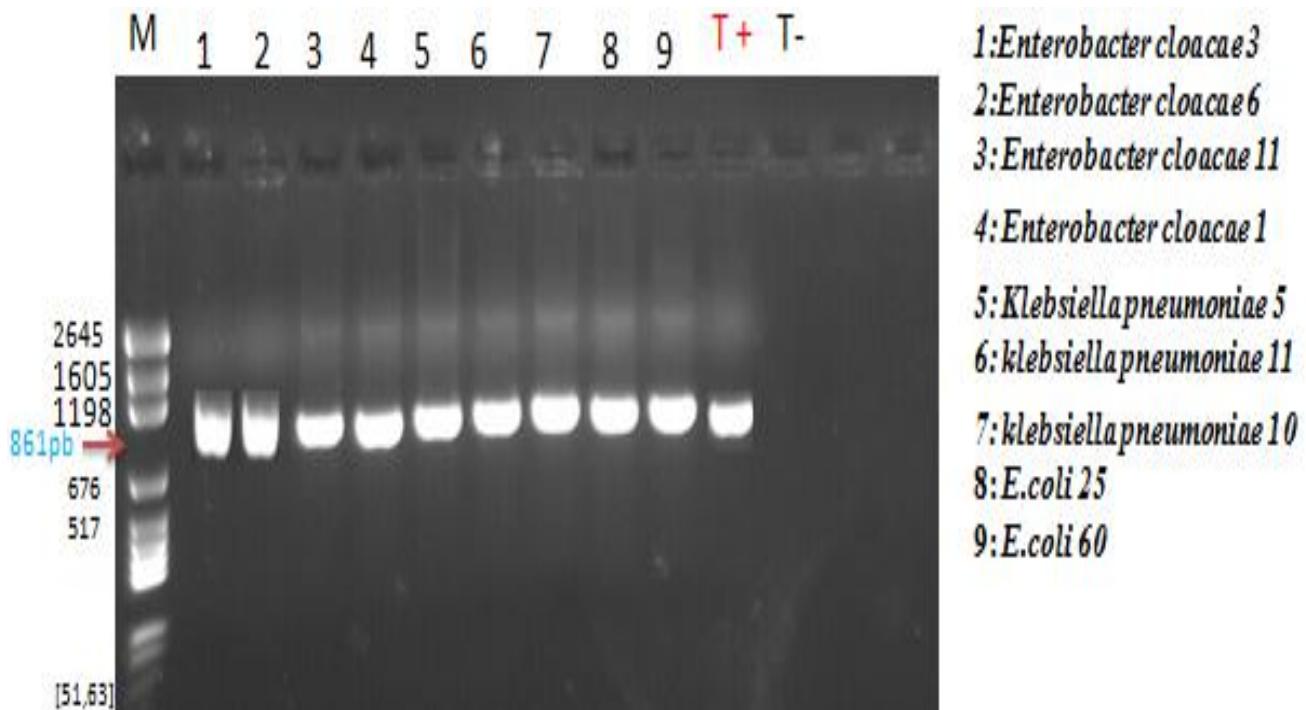


Figure N°45: Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *bla*_{TEM} pour les entérobactéries

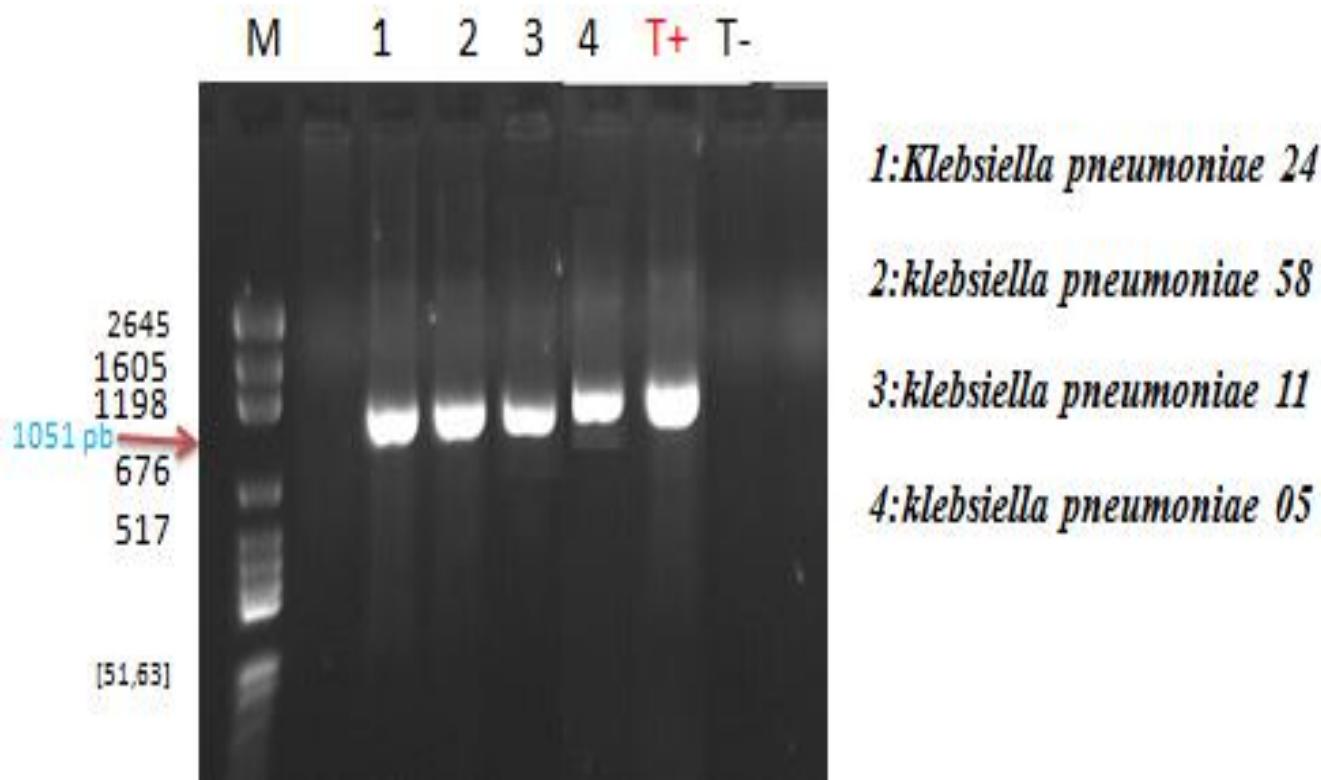


Figure N°46 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{SHV}* pour les entérobactéries

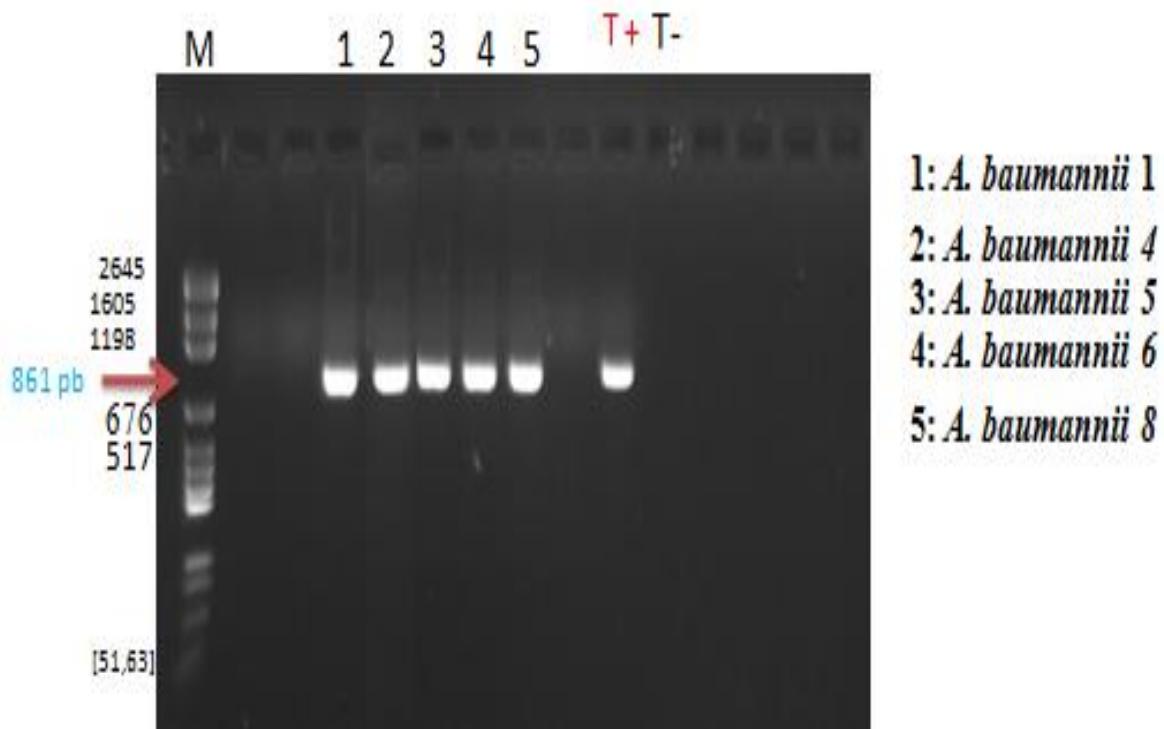


Figure N°47: Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{TEM}* pour *A. baumannii*

4.2. Recherche moléculaire des carbapénèmases :**✓ PCR en temps réel et standard :**

Le résultat de la PCR en temps réel et standard a montré que parmi les 20 souches des entérobactéries résistantes à l'Ertapénème, 2 souches sont porteuses du gène *bla*_{OXA-48}, *Klebsiella pneumoniae* N°(24, 58) (Figure 48). D'après nos résultats, aucune souches ne possède le *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}.

Parmi les 9 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'Imipénème , 2 souches étaient positives pour le test de l'EDTA (synergie IMP-ADTA)(*P. aeruginosa* ALG-2 et *P. aeruginosa* ALG- 19) et le résultat de PCR pour ces souches a révélé la présence du gène *bla*_{VIM} (Figure 49). Aucune souche ne possède le gène *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24} et *bla*_{OX-23}.

Toutes les souches d'*A. baumannii* résistantes à l' Imipénème étaient positives en utilisant le MHT et MCNP et 2 d'entres elles étaient positives pour le test de l'EDTA (synergie IMP-ADTA). La PCR a révélé la présence du : *bla*_{NDM-1} (*A. baumannii* N° 2, 7) (Figure 50) et *bla*_{OXA-23} : *A. baumannii* N°(1, 4, 5, 6, 8) (Figure 51). Parmi ces souches, aucune ne possède le gène *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{VIM} et *bla*_{IMP} .

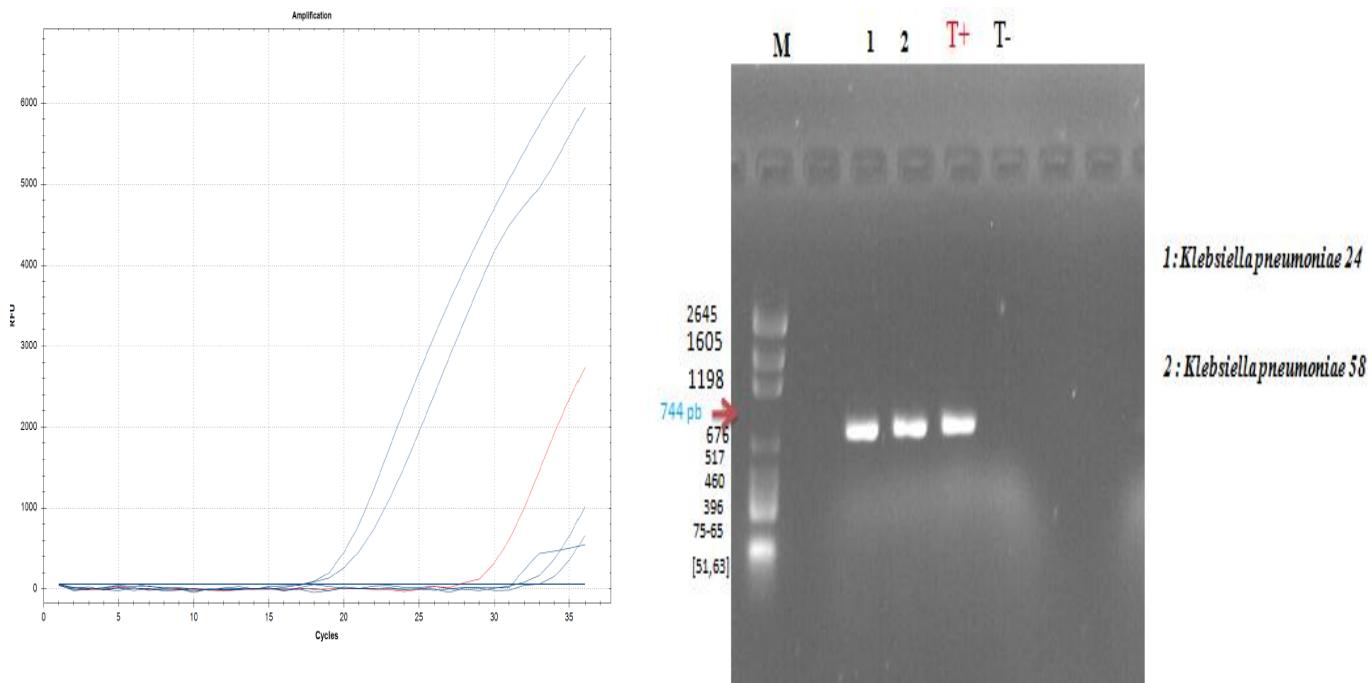


Figure N°48: Résultats des PCR du gène *blaOXA-48* pour les entérobactéries

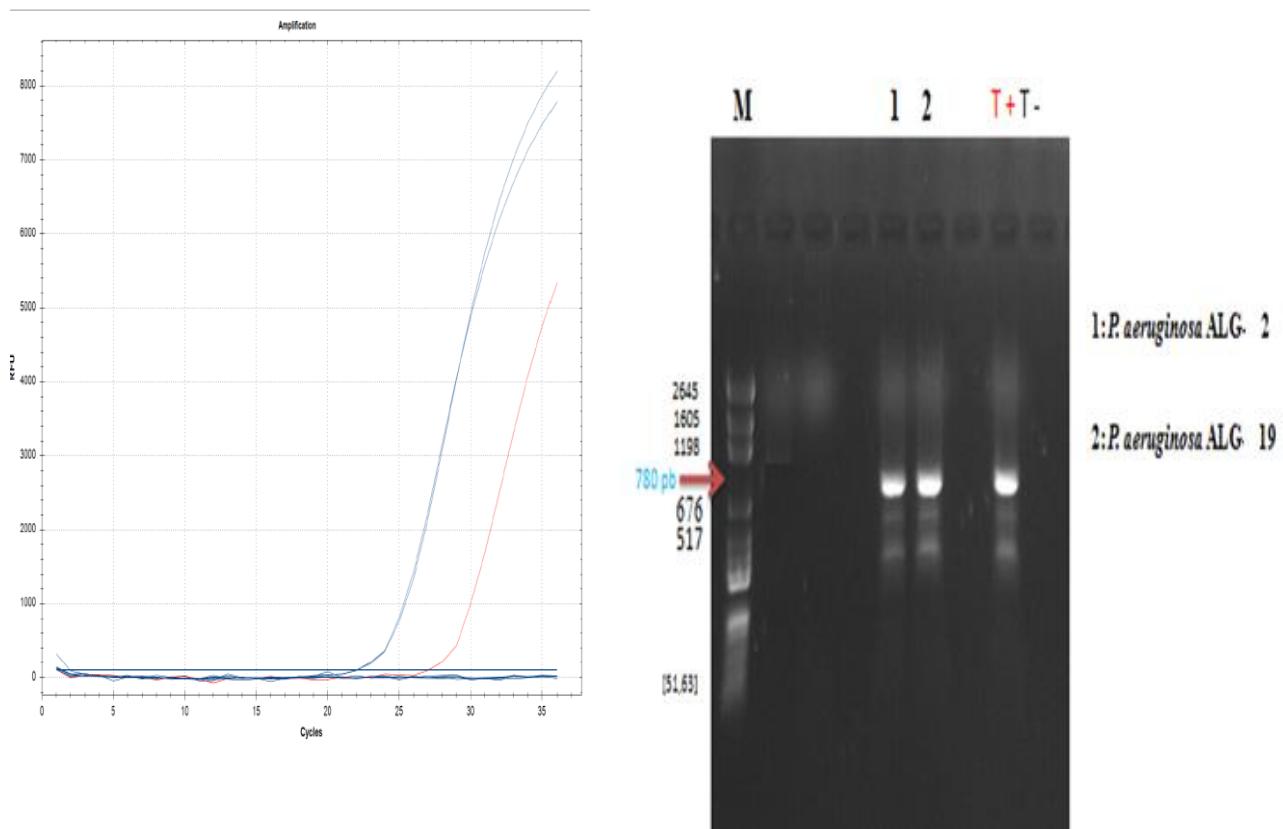


Figure N°49: Résultats des PCR du gène *blavIM* pour *P. aeruginosa*.

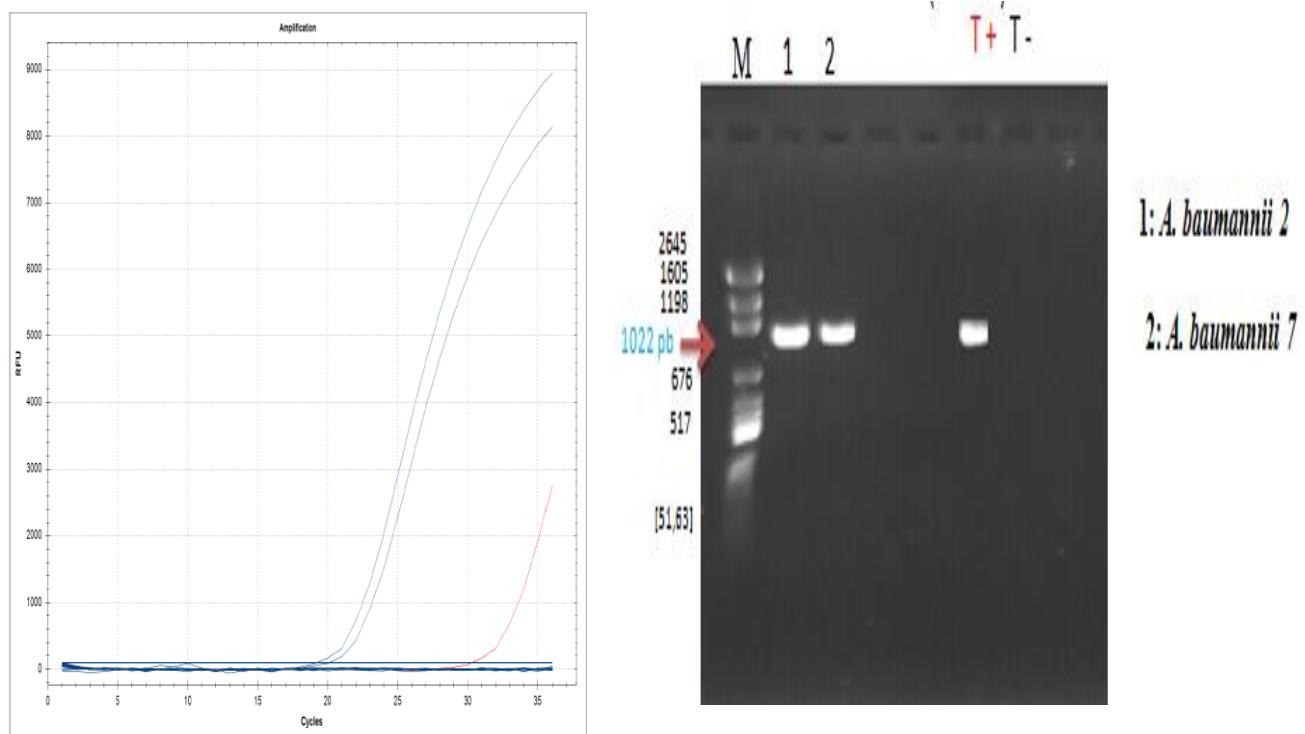


Figure N°50: Résultats des PCR du gène bla_{NDM-1} pour *A. baumannii*

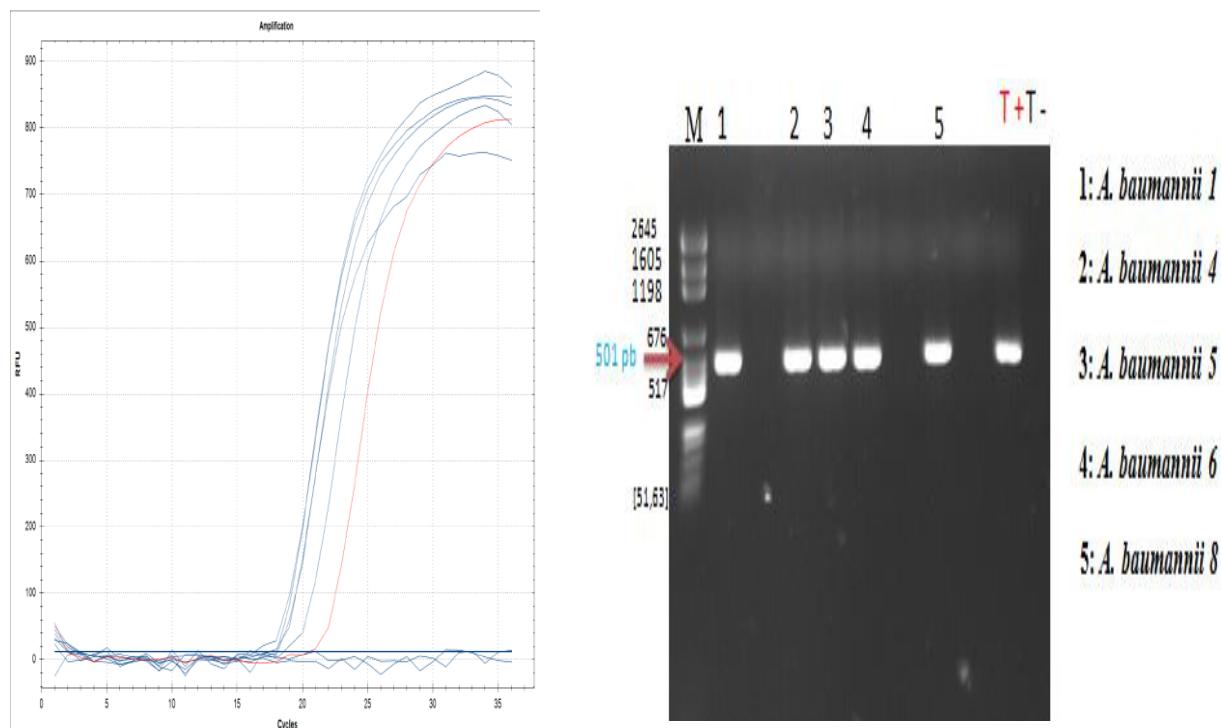


Figure N°51: Résultats des PCR du gène bla_{OXA-23} pour *A. baumannii*.

4.3. Recherche moléculaire de l'OprD :

✓ PCR standard :

Les résultats de PCR standard ont montré que : les 9 souches de *P. aeruginosa* Imipenème résistantes sont mutés au niveau des gènes codant la porine OprD (Figure 52).

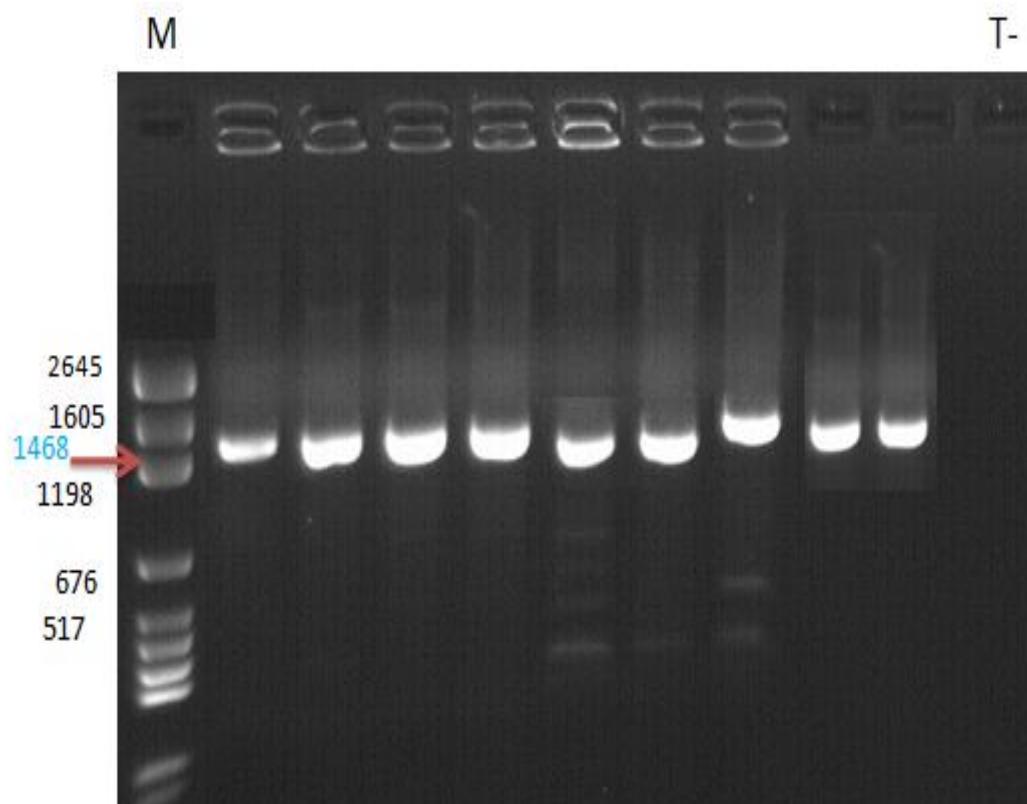


Figure N°52 : Résultat de PCR standard du porine OprD pour *P. aeruginosa*.

5. Séquençage et analyse des séquences :

Le séquençage et l'analyse des séquences des gènes par le logiciel codan code alingés, Blastés dans ARG-ANNOT ont montré que :

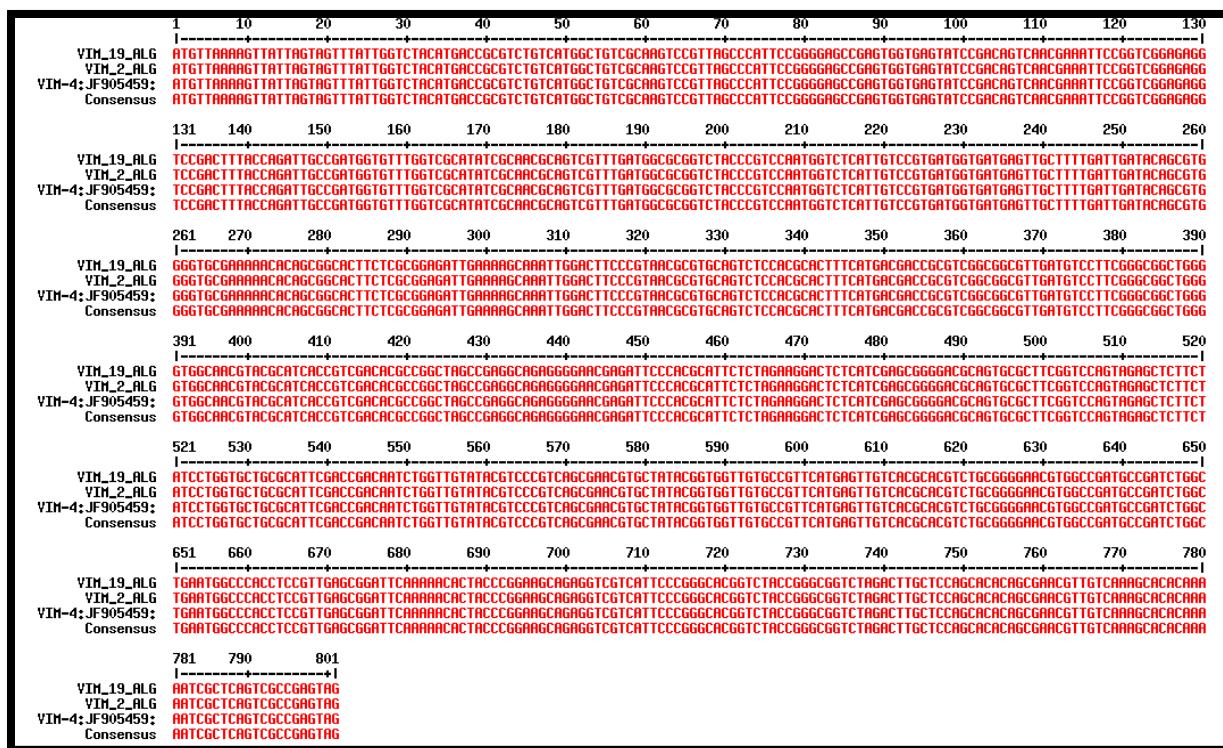
La majorité des gènes CTX-M appartenaient au variant de type CTX-M 15 du groupe 1 et qu'une seule souche possède le variant CTX-M-66 (*K. pneumoniae* N°10) et 2 souches possèdent le variant CTX-M-139 (*K. pneumoniae* N°10 et *E.coli* N°6).

Pour les gènes TEM et SHV après analyse des séquences on a révélé que tous les gènes TEM appartenaient au variant TEM-1 et quatre variants sont détectées pour le SHV(SHV-133 : *K. pneumoniae* N°24 et SHV-85 : *K. pneumoniae* N°58 , SHV-28 : *K. pneumoniae* N°11 et SHV-1 : *K. pneumoniae* N°5) (Annexe 3)

Pour *P. aeruginosa* l'analyse des séquences des produits de PCR purifiés du gène *blaVIM* obtenus à partir des 2 souches *P. aeruginosa* ALG-2(GenBank accession no KT698097) et ALG-19(GenBank accession no KT698096) résistantes à l'imipénème et positives au test de MHT et MCNP et l' EDTA, montre qu'elles appartenaient au variant *blaVIM-4*.(Figure 53 ,54) (Annexe 4)

Query id	Database id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap	QSS*	QSE**	DSS***	DSE****	e-value	Bit score
tmpseq_0	(Bla)VIM-4;JF905459:707-1507:801	100.00	693	0	0	1	693	94	786 0.0	1374	
tmpseq_0	(Bla)VIM-37;JX982636:1-801:801	99.86	693	1	0	1	693	94	786 0.0	1366	
tmpseq_0	(Bla)VIM-28;JF900599:1-801:801	99.86	693	1	0	1	693	94	786 0.0	1366	
tmpseq_0	(Bla)VIM-19;JF915116:1-801:801	99.86	693	1	0	1	693	94	786 0.0	1366	
tmpseq_0	(Bla)VIM-1;GU724868:1023-1823:801	99.86	693	1	0	1	693	94	786 0.0	1366	
tmpseq_0	(Bla)VIM-35;JX982634:1-801:801	99.71	693	2	0	1	693	94	786 0.0	1358	
tmpseq_0	(Bla)VIM-34;JX013656:1-801:801	99.71	693	2	0	1	693	94	786 0.0	1358	
tmpseq_0	(Bla)VIM-33;JX258134:1-801:801	99.71	693	2	0	1	693	94	786 0.0	1358	
tmpseq_0	(Bla)VIM-32;JN676230:1550-2350:801	99.71	693	2	0	1	693	94	786 0.0	1358	
tmpseq_0	(Bla)VIM-27;HQ858608:1-801:801	99.71	693	2	0	1	693	94	786 0.0	1358	
tmpseq_0	(Bla)VIM-26;FR748153:260-1060:801	99.71	693	2	0	1	693	94	786 0.0	1358	
tmpseq_0	(Bla)VIM-29;JX311308:1-801:801	99.57	693	3	0	1	693	94	786 0.0	1350	

Figure N°53 : Résultat de l'ARG-ANNOT pour *P. aeruginosa* ALG-2.



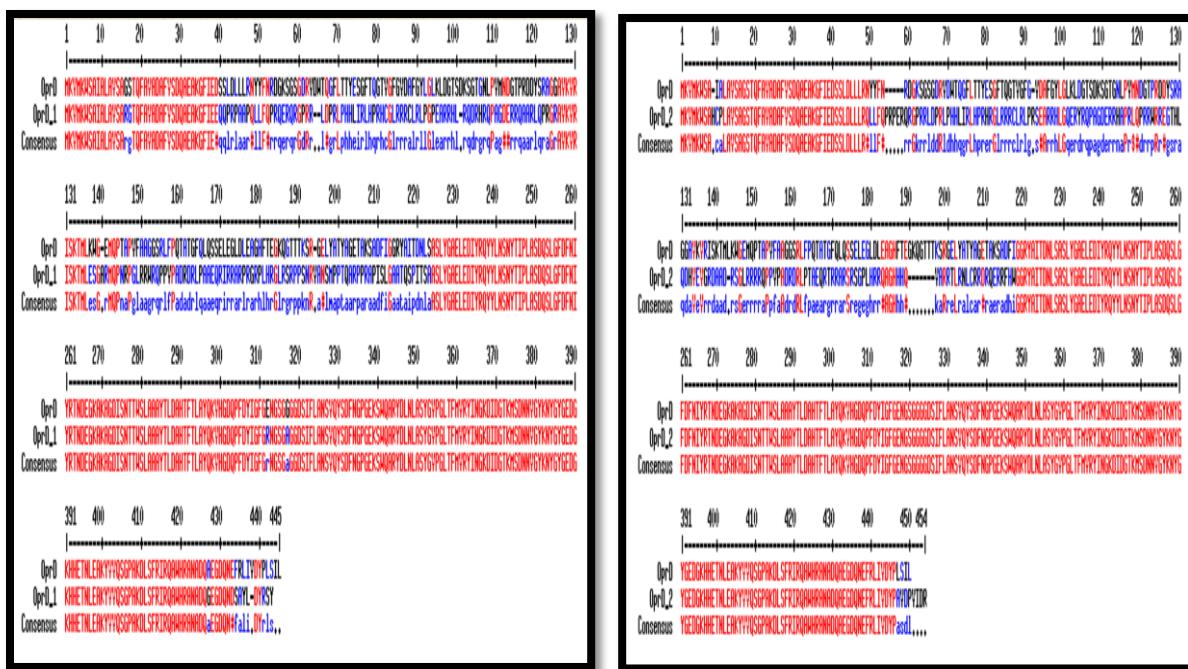


Figure N°55 : Alignements avec Clustal W de *P. aeruginosa* N°1 et *P. aeruginosa* ALG-2 avec la souche de référence PAO1.

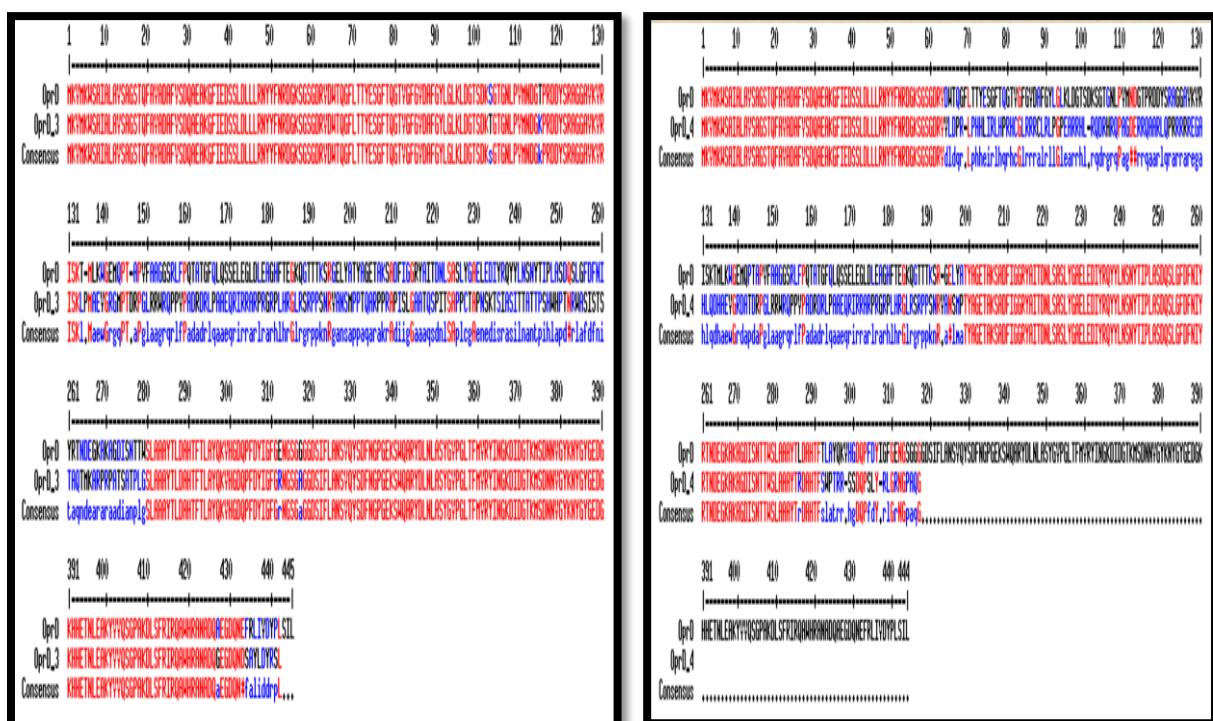


Figure N°56 : Alignements avec Clustal W de *P. aeruginosa* N°3 et *P. aeruginosa* N°4 avec la souche de référence PAO1

6. Arbre phylogénétiques :

Les séquences obtenues de CTX-M ont été alignées par le logiciel Clustal X, ensuite analysées par le logiciel Mega version 5 , par la méthode Nearest-Neighbor Interchange(NNI) avec le modèle de distance paramètre Kimura 2 et les valeurs de bootstrap sont exprimées 1000 répétitions et présentées à un point de branchement, tout ca pour construire un arbre phylogénétique, son objectif consistait à explorer, découvrir, et analyser l'ADN et les séquences protéiques dans une perspective évolutive (Figure 57).

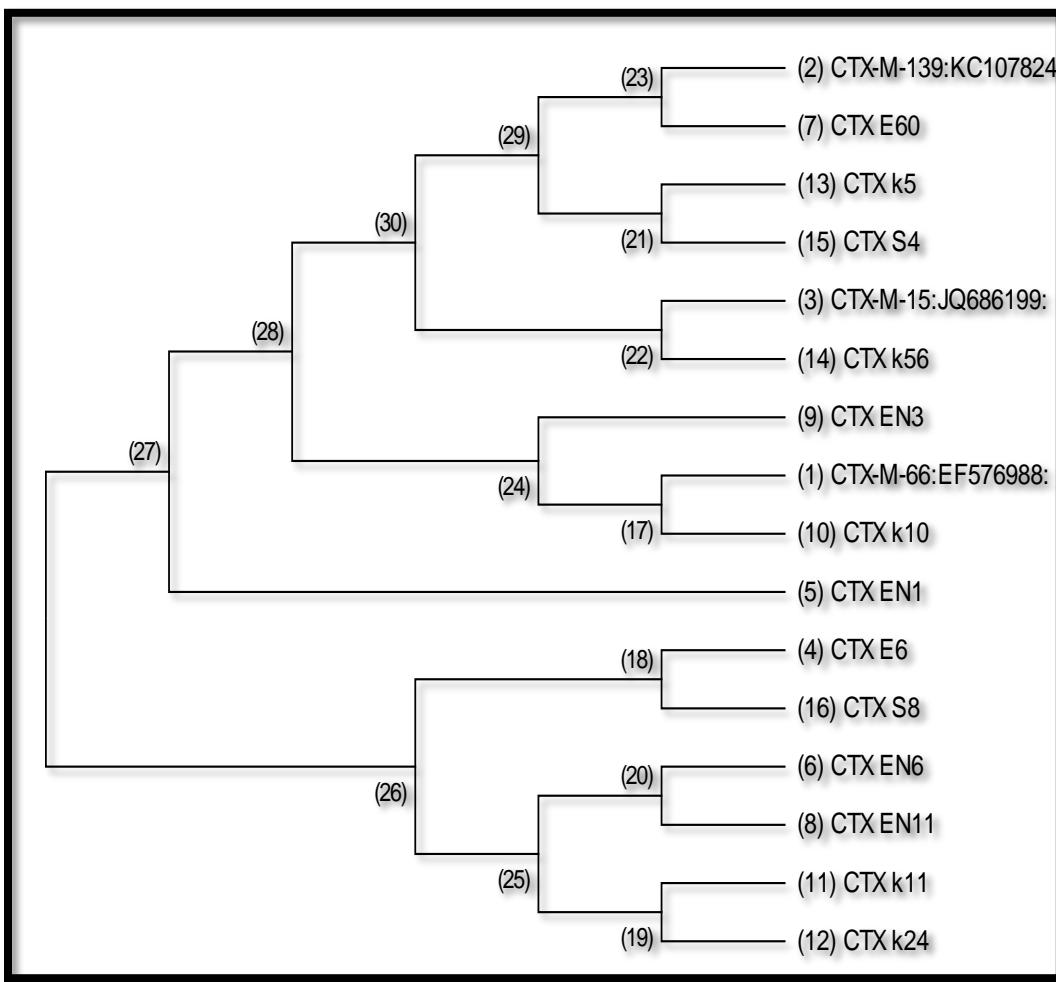


Figure N°57: Arbre phylogénétique du gène *bla_{CTXM}* avec les souches de référence

l'arbre phylogénétique pour les 2 séquences de *P. aeruginosa* ALG- 2 et ALG-19 a été réalisé avec 20 souches de référence des variantes des gènes VIM , le résultat révèle que les 2 souches appartenaient à la même branche de la souches de référence VIM -4: JF905459 qui confirme nos résultats .(Figure 58)

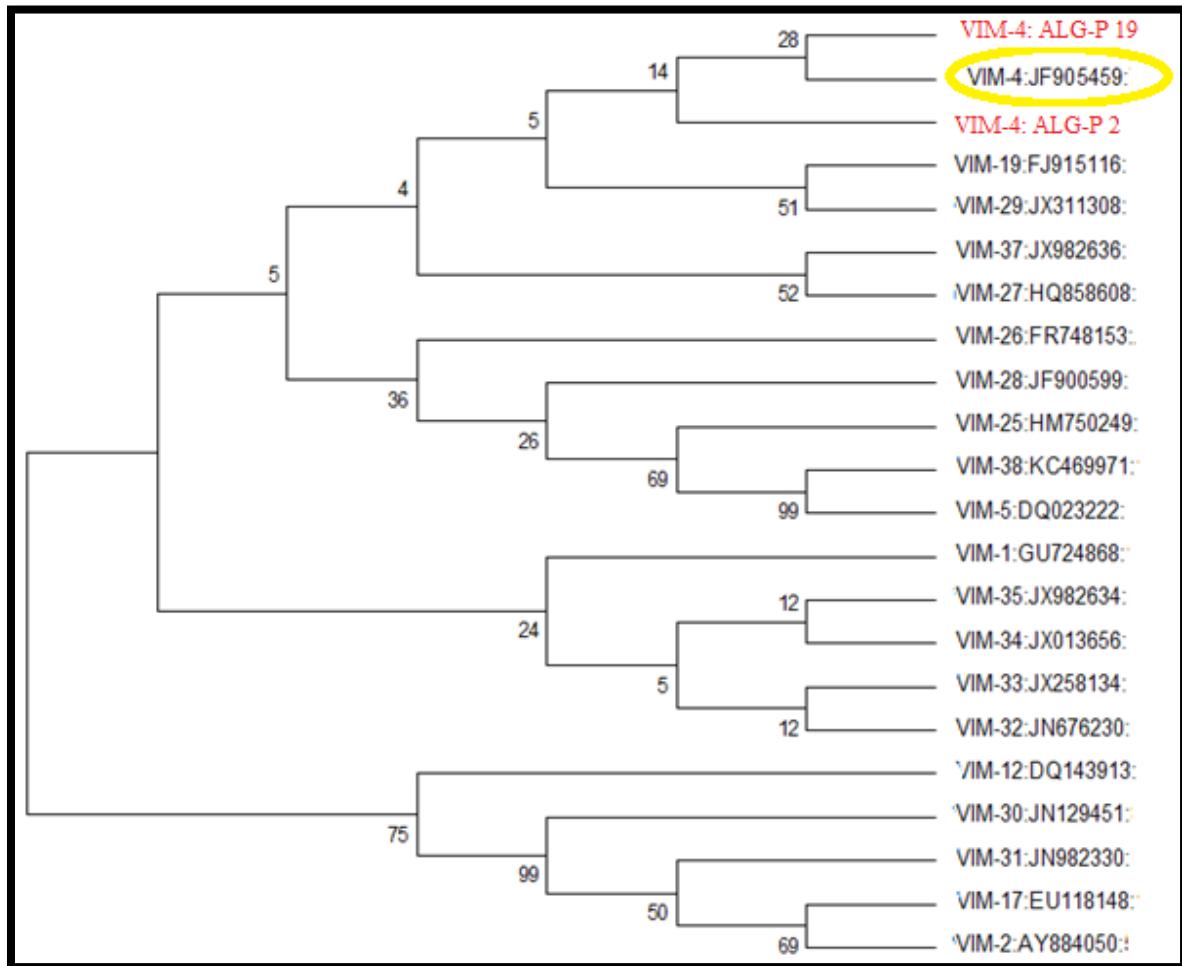


Figure N°58: Arbre phylogénétique du *P. aeruginosa* ALG-2 et ALG-19 avec les souches de référence de VIM.

7.Typage des souches :**7.1. Biotypepage par MALDI-TOF :**

Dans notre étude , le résultat du dendrogramme (Figure N°59) a révélé que nos souches de l'est Algérie se regroupe en 3 clones :

Clone 1 : qui regroupe les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Clone 2 : qui regroupe les souches de 2 espèces des entérobactéries : *Serratia spp.* et *E.coli*

Clone 3 : qui regroupe d'autres isolats des entérobactéries : *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* , *Morganella morganii* , *Providencia spp.* et *Citrobacter spp.*

Pour chaque espèce des entérobactéries et des bactilles à Gram négatif non fermentants , un dendrogramme est réalisé et les résultats sont illustrés par les figures ci-dessous (Figure 60,61,62,63,64,65) :

✓ **Entérobactéries :**

Pour *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* et *Proteus spp.*, le résultat du dendrogramme (Figure 60,61,62,63) a révélé que nos souches de l'est Algérie pour chaque espèce se regroupe en 2 clones ce qui suggère qu'on est en présence de deux types d'épidémies (clone 1 et 2) dans les trois villes (Annaba, Skikda et Guelma) . (pour *Klebsiella spp.* on note que dans le clone 2 on remarque la présence de souche N°24 de Skikda et N°58 de Annaba) Le résultat du dendrogramme (Figure 64) pour *E. coli* a révélé que nos souches se regroupent dans un même clone ce qui suggère qu'on est en présence d'une petite épidémie dans les trois villes (Annaba , Skikda et Guelma) .

✓ **Bacilles à Gram négatif non fermentants :**

Le dendrogramme de *P. aeruginosa* (Figure 65) a révélé la présence de 3 clones (clone 1 rassemble les deux souches ALG-19 de Annaba et ALG-2 de Skikda) ce qui suggère la présence de trois types d'épidémies dans les trois villes.

Pour *Acinetobacter baumannii* on remarque la formation de deux clones , ce qui montre la présence de deux types d'épidémies (la 1^{ère} se trouve dans la ville de Skikda (clone 1) et la 2^{ème} dans la ville de Annaba (clone 2) (Figure 63).

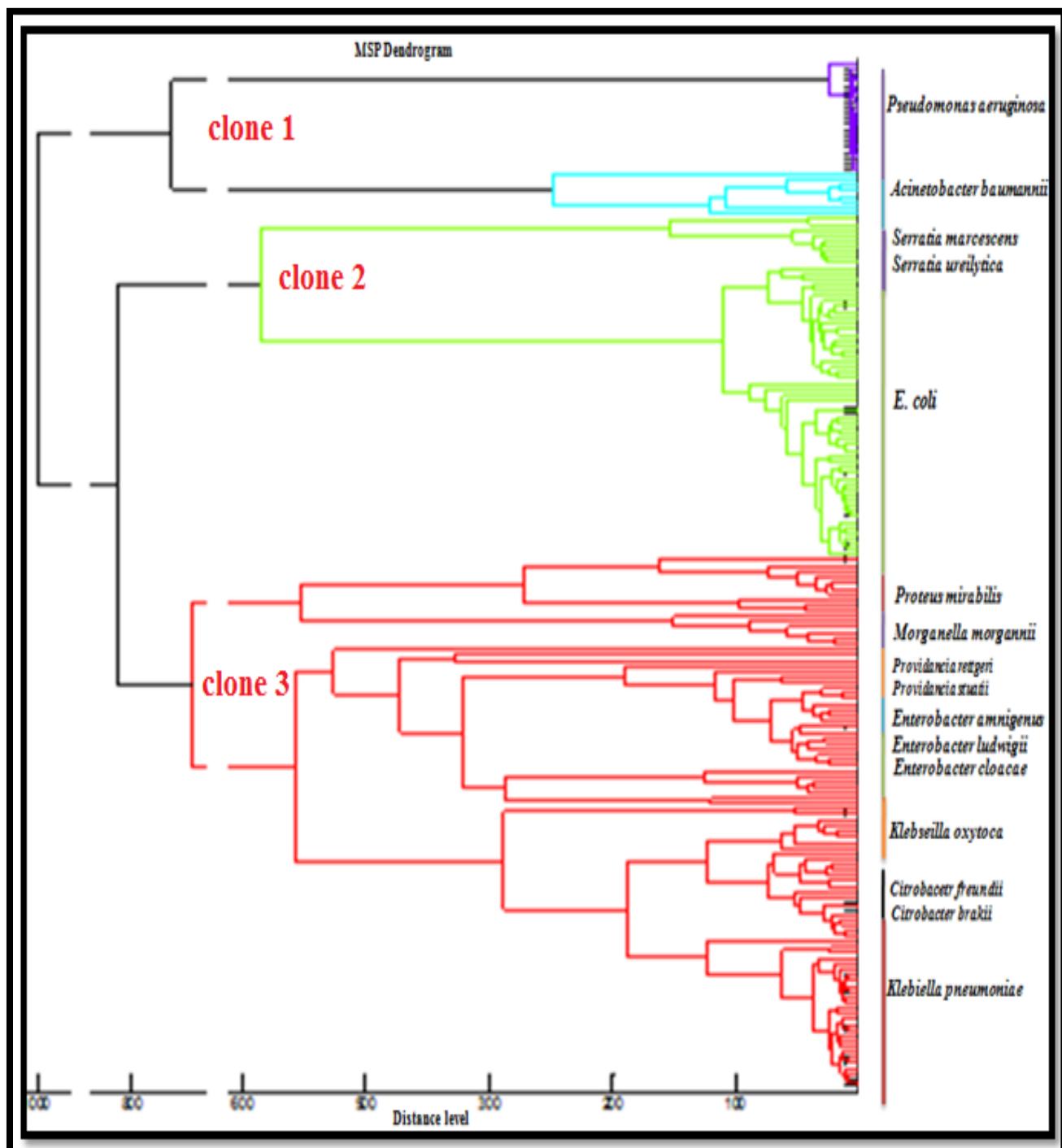
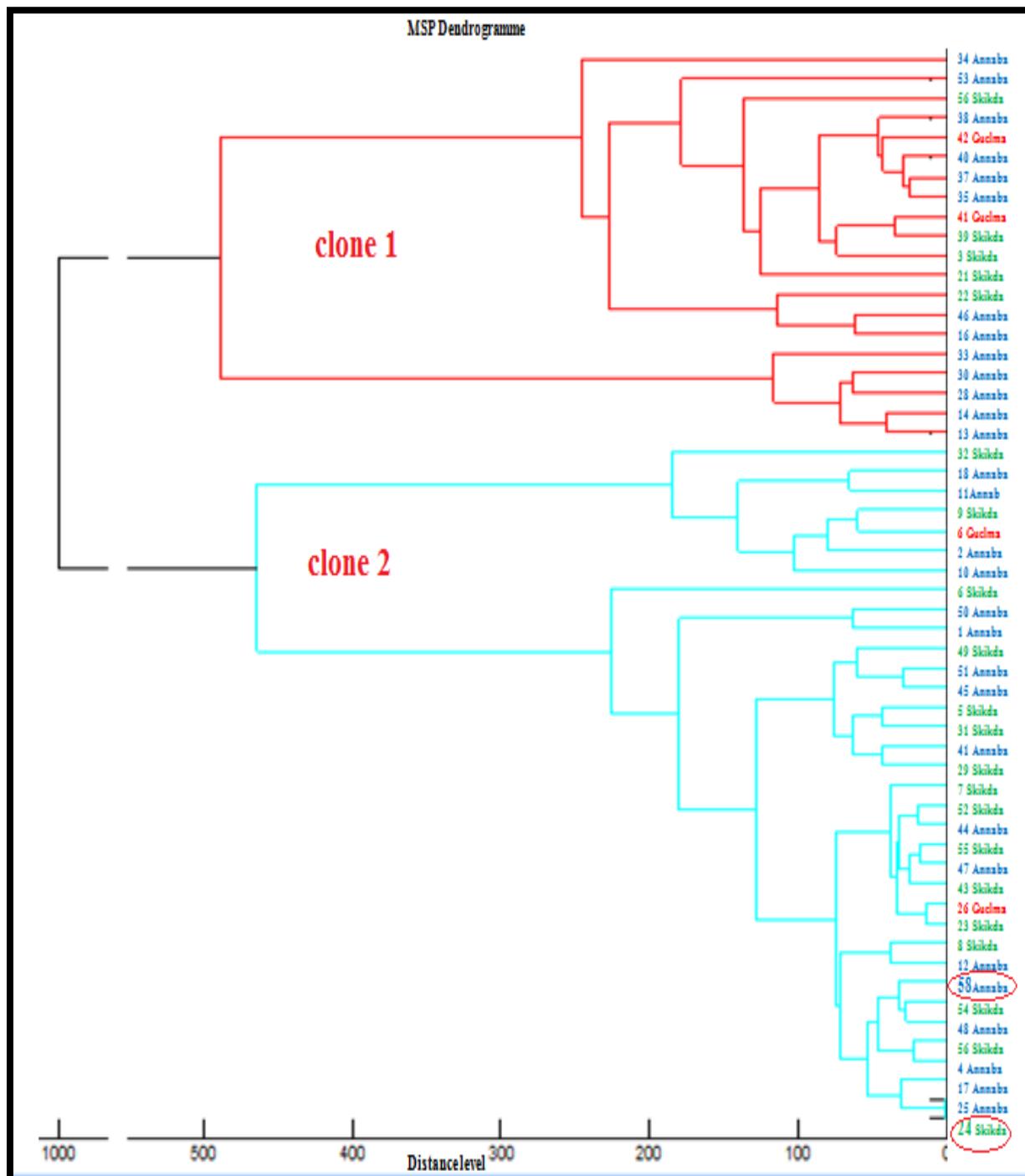


Figure N°59 : Biotypage des bactéries à Gram négatif isolées aux trois villes de l'est Algérie par MSP dendrogramme



Bleu :Annaba, Vert : Skikda, Rouge : Guelma.

Figure N°60 : Biotypepage des *Klebsiella spp.* par MSP dendrogramme

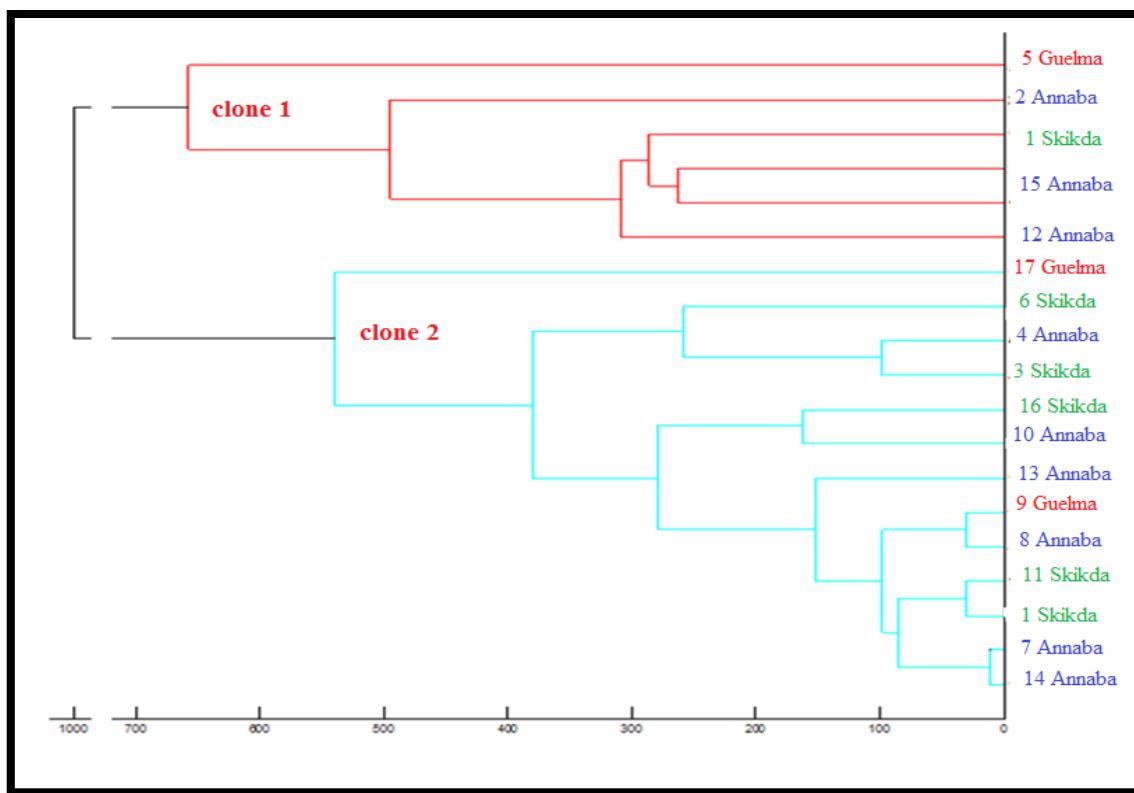


Figure N° 61 : Biotypepage des *Enterobacter* spp. par MSP dendrogramme

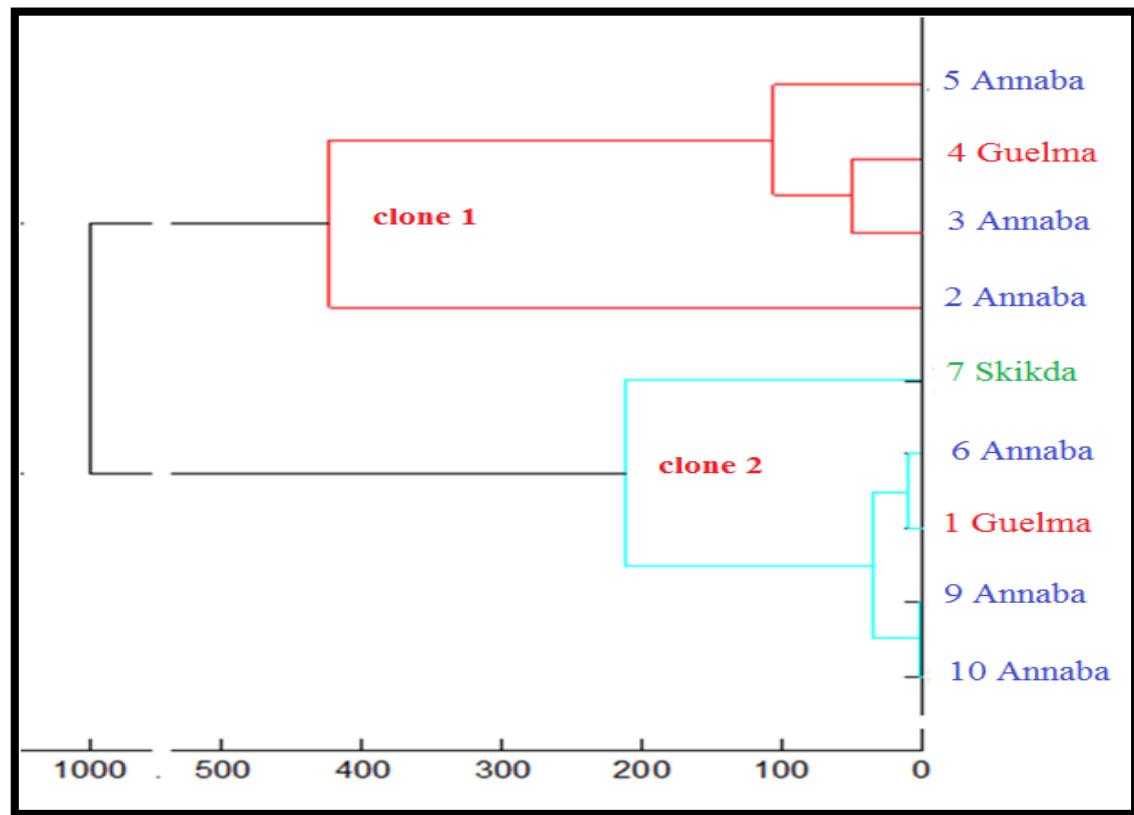


Figure N°62 : Biotypage des *Serratia spp.* par MSP dendrogramme.

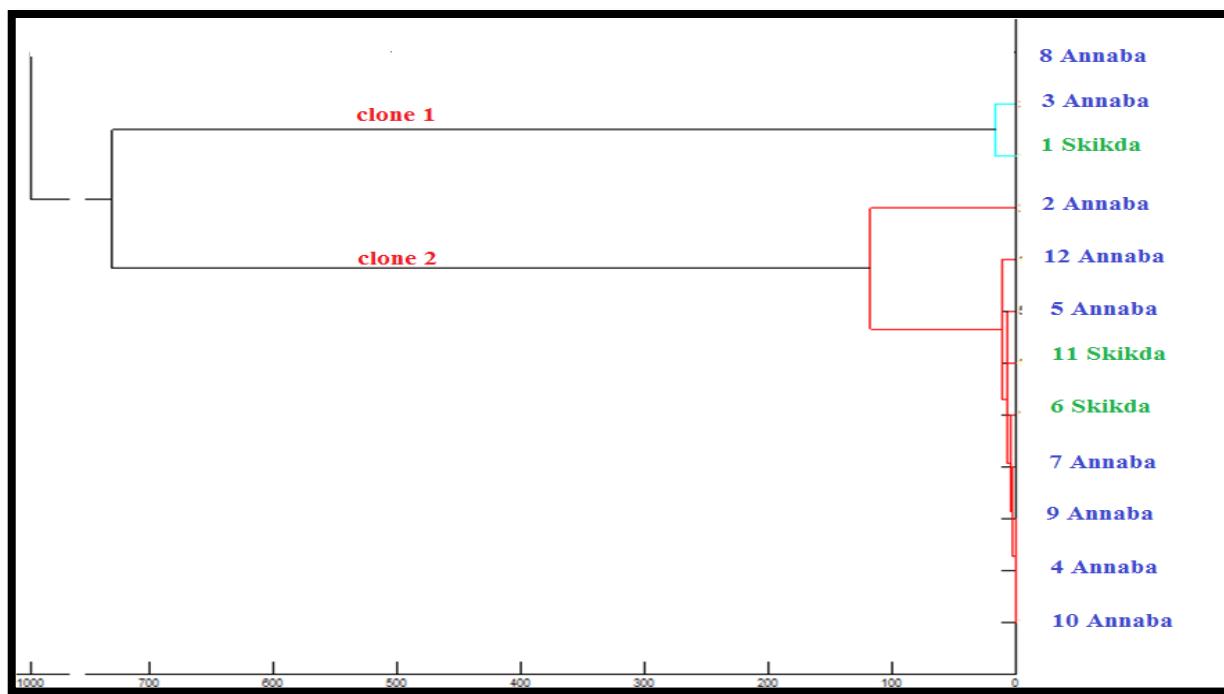


Figure N°63 : Biotyping des *Proteus spp.* par MSP dendrogramme.

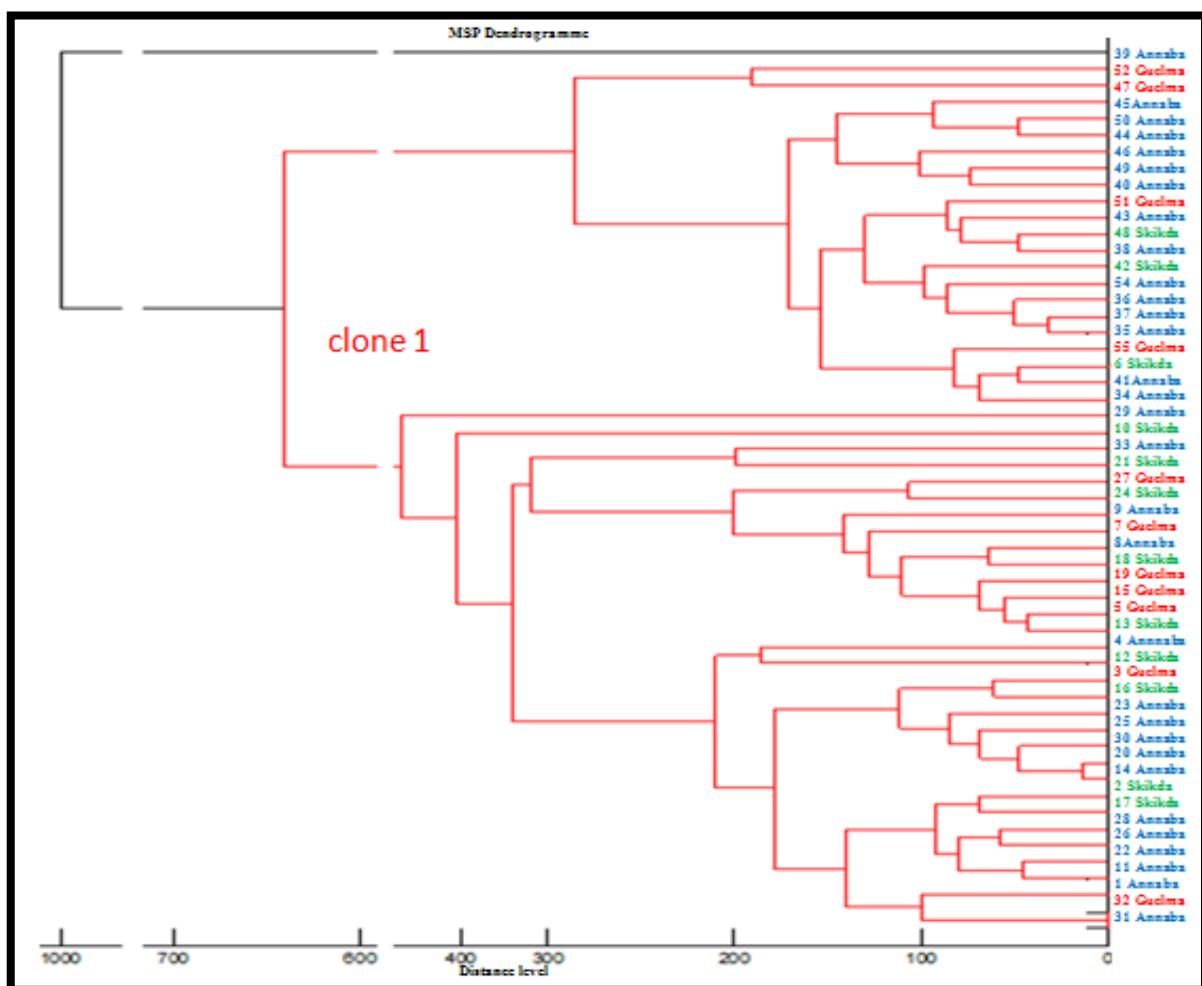


Figure N°64: Biotyping des *E. coli* par MSP dendrogramme.

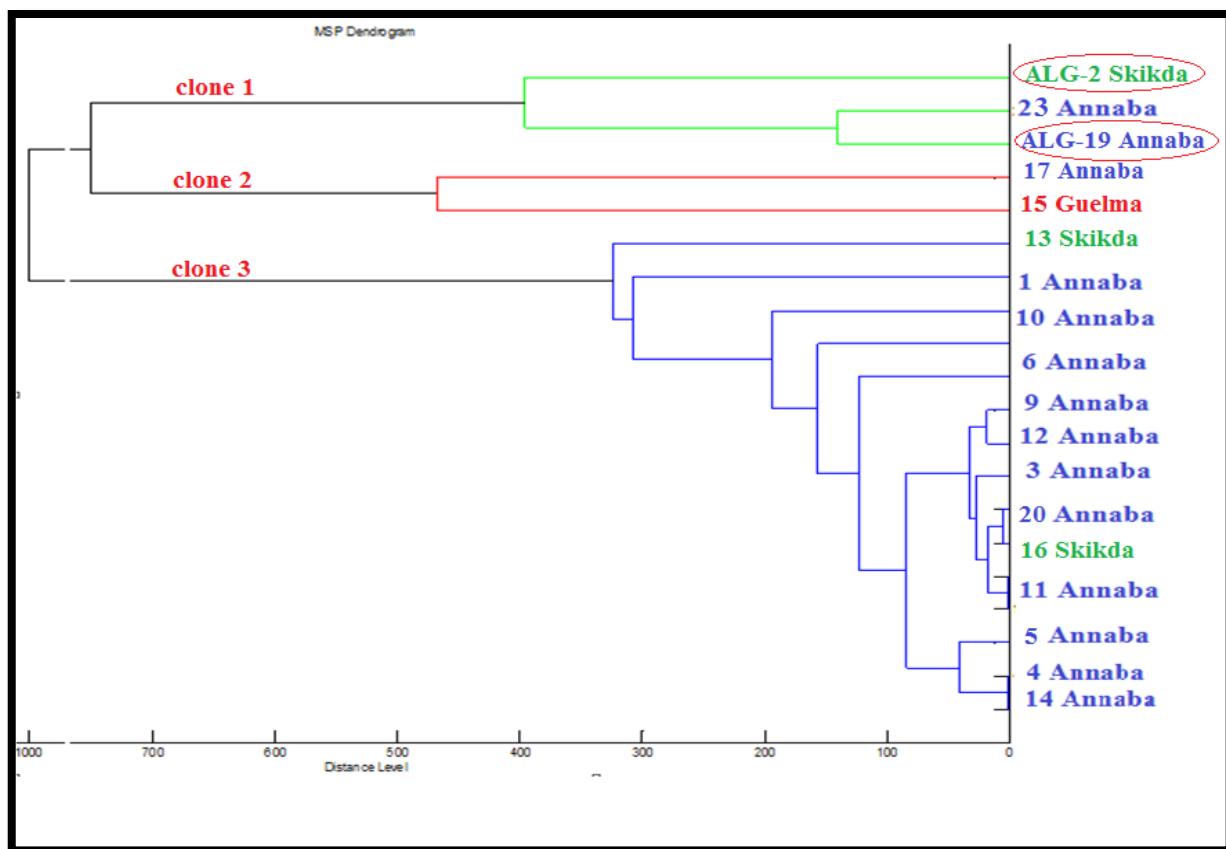


Figure N°65 : Biotyping des *P. aeruginosa* par MSP dendrogramme.

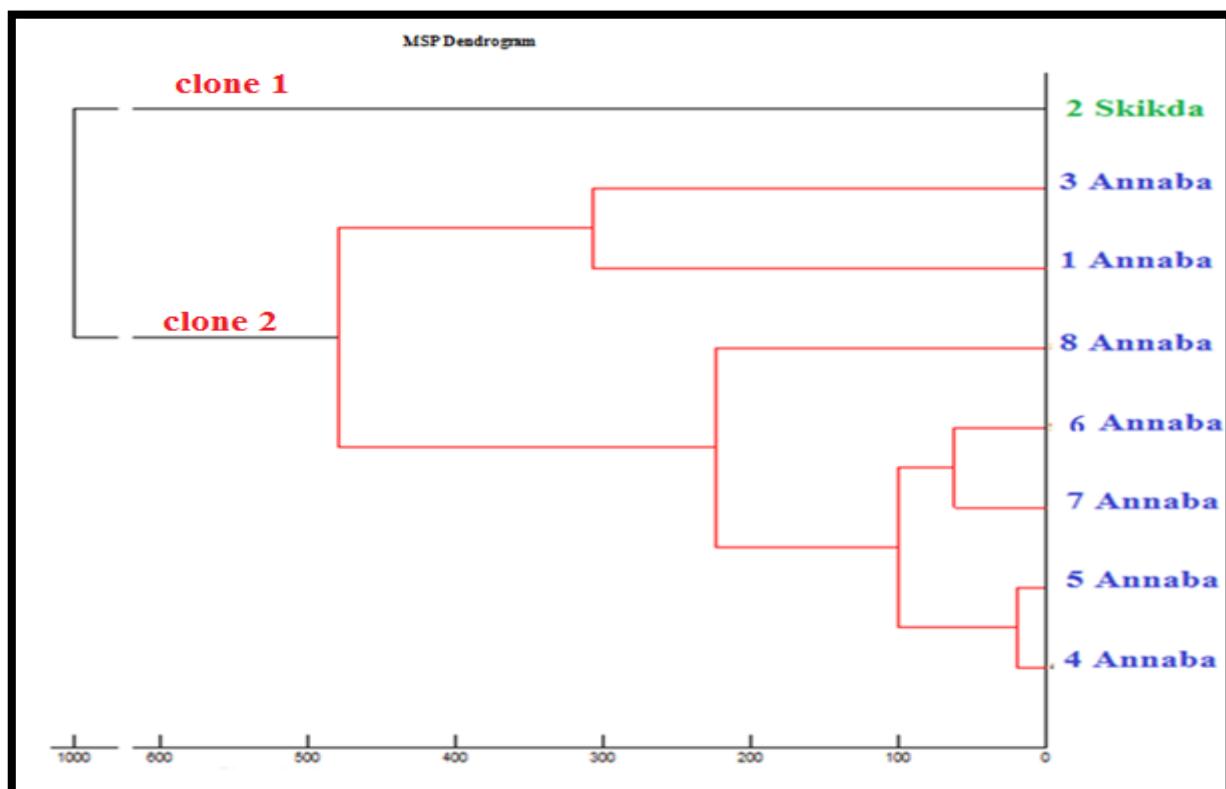


Figure N°66 : Biotyping des *Acinetobacter baumannii* par MSP dendrogramme.

7.2. Génotypage par MLST :

La recherche de la clonalité a été déterminée pour les souches résistantes aux carbapénèmes (Imipénème, Ertapénème) , *P. aeruginosa* N°(1, ALG-2,3,4,5,11, ALG-19,20,23) , *K. pneumoniae* N°(24,58) et les 7 isolats d'*A. baumannii* .

L'amplification par PCR standard des 7 gènes de ménage a été effectuée pour l'espèce *K. pneumoniae* :(*gapA, infB, mdh, pgi, phoE, rpoB*, et *tonB*), *P. aeruginosa* :(*acsA, aroE, mutL, ppsA, gua A, nuoD, trpE*) (Figure 67) et *A. baumannii* : (*cpn60, fusA, gltA, pyrG, recA, rplB, rpoB*). Après le séquençage des produits PCR des 7 gènes, les résultats sont soumis dans les bases de données du site web : (www.pasteur.fr/mlst)(pour *K. pneumoniae* et *A. baumannii*) et (www.pubmlst.org)(*P. aeruginosa*)(Tableau 29 , Tableau 30, Tableau 31)

Le génotypage par MLST a révélé la présence de 2 clones pour *K. pneumoniae* ST404 et ST 219 (Tableau 29) et aussi 2 clones pour *A. baumannii* ST 2 et ST 85 (Tableau 30). Le MLST pour *P. aeruginosa* , a révélé qu'elles appartiennent à 5 différents types de ST, ST (244,1076,241,227,233) (Tableau 31)

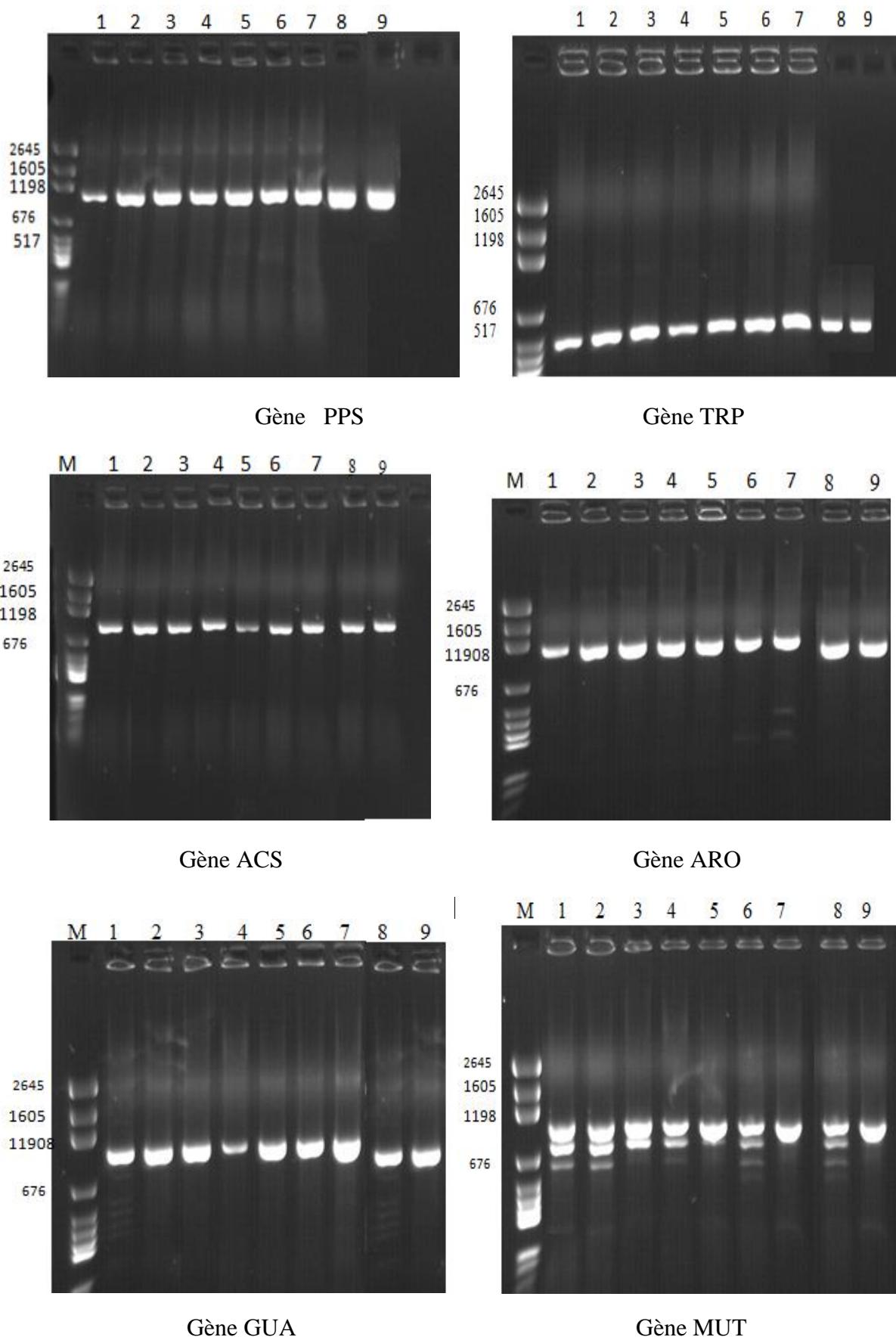


Tableau N°29 : Génotypage des *K. pneumoniae* résistantes à l'Ertapénème par MLST

N° Souches	Allèles							Séquence Type (ST)
	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>gapA</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	
24	1	2	3	2	27	1	39	219
58	1	2	1	2	1	1	2	404

Tableau N°30: Génotypage des *A. baumannii* résistantes à l'Imipénème par MLST

N° Souches	Allèles							Séquence Type (ST)
	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>	
1	2	2	2	2	2	2	2	2
2	5	2	4	1	3	3	4	85
4	2	2	2	2	2	2	2	2
5	2	2	2	2	2	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2	2	2
7	5	2	4	1	3	3	4	85
8	2	2	2	2	2	2	2	2

Tableau N°31 : Génotypage des *P. aeruginosa* résistantes à l'Imipénème par MLST

N° Souches	Allèles							Séquence Type (ST)
	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
1	17	5	12	3	14	4	7	244
ALG-P2	5	4	57	62	1	1	26	1076
3	17	5	11	5	4	4	7	241
4	38	11	3	9	1	2	4	227
5	16	5	30	11	4	31	41	233
11	17	5	12	2	14	4	4	244
ALG-P19	5	4	57	62	1	1	26	1076
20	17	5	12	3	14	4	7	244
23	5	4	57	1	1	1	26	1076

pour *P. aeruginosa* : a partir de l'analyse de l'arbre phylogénétique, nous avons identifié 2 clones : clone A du ST 244 qui appartient au groupe 1(G1) de L'OprD qui comprend 3 souches N (1, 20, 11) isolées au niveau du service des Brûlés a l'hôpital Iben Sina Annaba , et le clone B du ST 1076 qui appartient au groupe 2(G2) de L'OprD qui comprend 3 souches :2 souches isolées au niveau du service des Brûlés à l'hôpital Iben Sina Annaba et 1 souche isolée au niveau du service de pédiatrie a l'hôpital Abderrezak Bouhara Skikda N (23, ALG-19, ALG-2)(Figure 68)

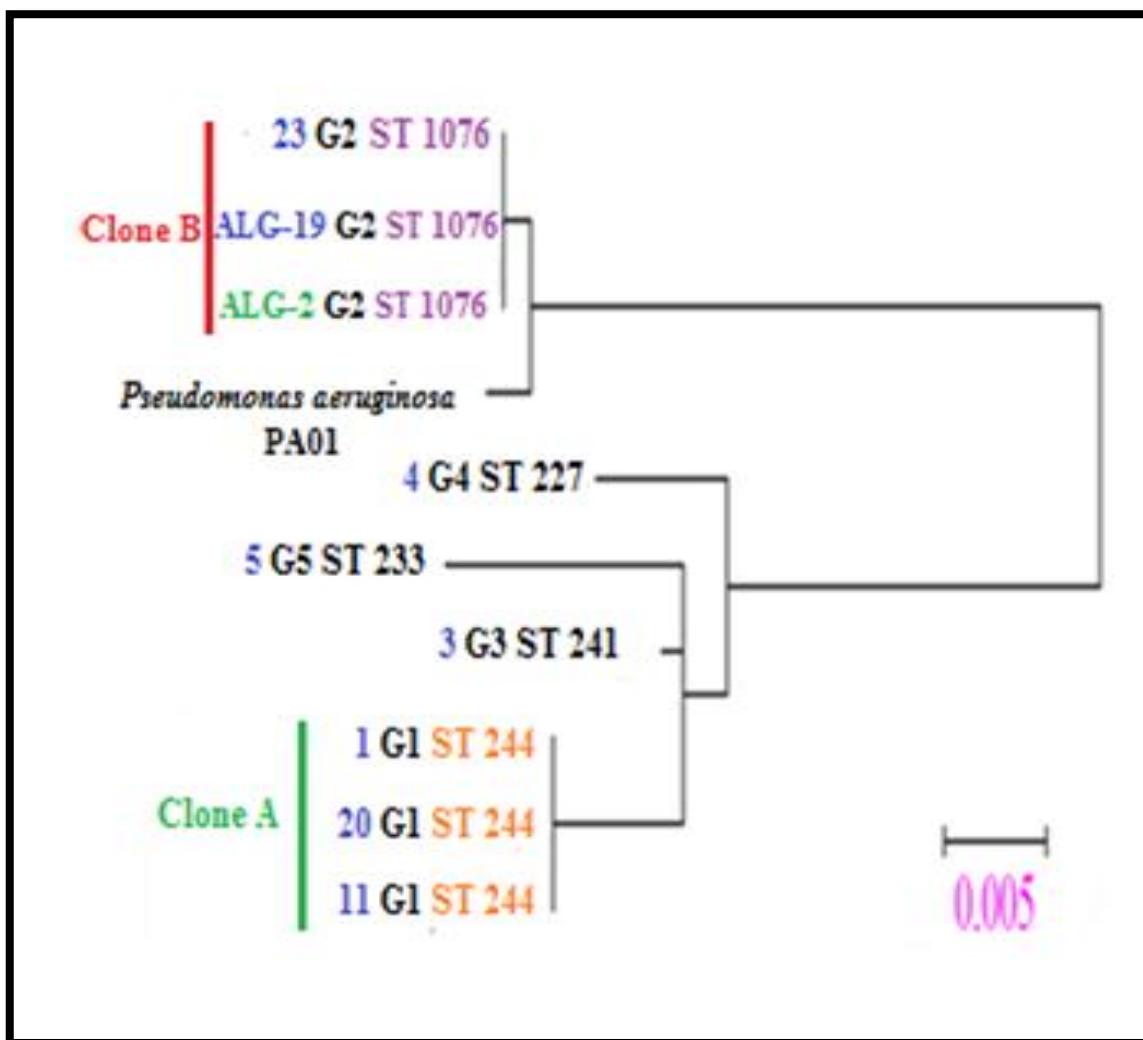


Figure N° 68 : Génotypage des *P. aeruginosa* par MLST

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène actuellement préoccupant dans les pays en voie de développement où les pathogènes résistants aux antibiotiques peuvent avoir une plus forte prévalence dans certains pays.

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

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif constituant l'une des plus importantes familles des bactéries. Certaines bactéries sont pathogènes strictes et d'autres pathogènes opportunistes, elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales.

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des bactéries opportunistes, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales (INC) sur la scène mondiale, souvent responsables d'infections pulmonaires et de bactériémies sévères, notamment dans les unités de soins intensifs. Deux principales bactéries de ce vaste groupe sont les plus fréquemment isolées lors d'INC : *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

Ces infections nosocomiales sont à l'origine de mortalité et de morbidité élevées partout dans le monde, un problème aggravé lorsque ces bactéries acquièrent des gènes de résistance aux antibiotiques.

Par conséquent, notre travail a porté les étapes suivantes :

✓ **Identification des souches :**

L'identification des souches a été réalisée pour la 1^{ère} étape par API20(NE ou E) ensuite la confirmation par le MALDI-TOF MS, ce dernier a donné un très bon score d'identification pour toutes les espèces étudiées. L'ensemble des publications confirme le rôle des systèmes MALDI-TOF MS comme outil d'identification de première ligne dans un laboratoire de routine, mais insiste également sur l'importance des mises à jour de la base de données (**Descy , J. et al., 2010**)

Cette identification a permis de deviser les bacilles à Gram négatif en : Entérobactéries 161 (84.4%), et les Bacilles à Gram négatif non fermentants 25 (13.3%), ce résultat a été rapporté par l'étude de Ennigrou qui montre la prédominance des entérobactéries (59 %) (**Ennigrou, S., et al., 2000**).

Pour les entérobactéries : la dominance a été également observée pour *Klebsiella spp.* 55 (29.4%) , ce résultat a été rapporté par l'étude de Atena (**Atena, A., et al., 2016**) , Wolf (**Wolf, B., et al., 2001**) et concordantes avec l'études de Turmel Jean-Marie (**Turmel J-M., 2014**) et El mahi Fadoua (**El mahi , F., 2013**) et Lahlou Amine (**Lahlou A., I., 2010**) qui ont montré que *E.coli* était l'espèce la plus fréquemment isolée.

Pour les bacilles à Gram négatif non fermentants : *P. aeruginosa* représente plus de 18 (9.6%) des souches isolées à partir de pourcentage total (13.3%) , la prévalence de *P. aeruginosa* a été aussi rapportée par Touati (**Touati, M., 2013**) , contrairement à la littérature où *A. baumannii* était l'espèce la plus isolée suivi de *P. aeruginosa* (**Li, M., et al ., 2013**). En effet, une étude récente de l'observatoire national d'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques ONERBA a montré que *P. aeruginosa* est responsable de 10% des infections nosocomiales dans les hôpitaux Français (**Bertrand, X. , et al., 2008**) . Alors que dans une étude réalisée par le comité de lutte contre les infections nosocomiales Français, les souches de *P. aeruginosa* ont représenté 24 % de l'ensemble des bacilles à Gram négatif isolés (**Lepape, A., 2003**) . Ce pourcentage est élevé par rapport à celui retrouvé durant notre étude (9.6%).

En Algérie, selon le 14^{ème} Rapport (2012-2013) de la Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN), *P. aeruginosa* occupe la troisième place après *Staphylococcus aureus* et *Enterobacteriaceae* dans les infections nosocomiales au niveau des soins intensifs .(**AARN., 2015**)

Concernant *A.baumannii* dans notre étude, elle représente 4 % par rapport au total des espèces isolés. Egalement en France, cette espèce représente 2 à 5% des infections de laboratoire et 9% des infections nosocomiales (**Bouvet, PJM., 2000**)

✓ **Prévalence des souches :**

Selon la nature du prélèvement, notre étude a démontré que le pus était le spécimen le plus fréquent (61,29 %) , suivi par les urines (35,48%), sang (2,15%) et le liquide pleural (1,07 %) .

Nos résultats sont en accord avec d'autres études : Africaines , et européennes (**Rio, Y. , 2002 ; Souly, K., 2006**).

Ces souches ont été isolées chez les malades hospitalisés surtout dans les services de médecine interne et les services de chirurgie, résultats similaires à ceux retrouvés dans plusieurs études. Ainsi en Maroc , une étude réalisée a montré que 33.5% des souches isolées dans les services de médecine interne et 24.3% dans les services de chirurgie. (**Khayar ,Y., 2011**).

Dans notre étude, il y a une prédominance Féminine (63%), ce résultat dépend des types d'infections et des services d'hospitalisation, notre étude confirme aussi que les femmes ont plus de risque à développer une infection urinaire (**François, H., et al., 2006**). En effet, ceci peut s'expliquer par la brièveté de l'urètre féminin et les rapports sexuels qui favorisant la progression des bactéries urétrales dans la vessie. Elles peuvent aussi s'expliquer par les propriétés antimicrobiennes des sécrétions prostatiques chez l'homme (**Caron, F., 2003**).

Les adultes sont la tranche la plus touchée par les infections dans notre étude (80%) allant de 18 ans jusqu'à 88 ans, 20% des enfants dont l'âge varie entre 5 jours jusqu'à 18 ans , les interventions chirurgicales des personnes âgées font désormais partie du quotidien des services hospitaliers. Mais en chirurgie, le grand âge est un facteur de risque car le vieillissement entraîne une lente dégradation des fonctions de l'organisme, le corps perd sa capacité à s'adapter aux agressions. Avec l'âge, on voit aussi augmenter la fréquence de l'athérosclérose, de l'hypertension, de l'insuffisance rénale... Des pathologies qui peuvent se combiner, interagir entre elles, et donc compliquer la prise en charge chirurgicale et imposer encore plus de vigilance. (**Caron, F., 2003 ; Bernard, W., 2006**).

✓ **La résistance aux antibiotiques :**

La résistance bactérienne aux antibiotiques est l'un des problèmes de santé publique mondiaux les plus graves. De nombreuses espèces responsables des maladies infectieuses ne réagissent plus aux antibiotiques courants. Compte tenu de la gravité du problème, si des mesures concertées ne sont pas prises à l'échelle mondiale, nous risquons de revenir à l'ère pré-antibiotiques (**OMS, 2005**).

- **Les entérobactéries :**

Le premier fait marquant de notre résultat pour les entérobactéries est le taux de résistance à l'Ertapénème, notamment pour les *Enterobacter spp.* avec un taux de 46,6 % , *Serratia spp.* 22,2%, *Klebsiella spp.* 20% et *E. coli* 12,7% avec une sensibilité totale à l'Imipénème . Notre résultat est la première étude à Annaba et Skikda qui détecte des entérobactéries résistantes à l'Ertapénème . Cependant plusieurs publications dans le monde ont rapportés la résistance des entérobactéries à l'Ertapénème (**Péan, Y., et al., 2006 ; Sotto, A., et al., 2008 ; Moquet, O., et al., 2011 ; Zemmouri, A., et al., 2015**).

En effet, selon la Lettre d'information du (**CA-SFM, 2012**) en se basant sur la concentration critique et le diamètre critique , on doit suspecter la production d'une carbapénémase lorsque la CMI de l'Ertapénème est $> 0,5$ mg/L ou lorsque le diamètre d'inhibition autour du disque d'Ertapénème est < 28 mm disques de 10 μ g par test de diffusion en gélose sur Mueller Hinton , ce qui est le cas pour 20 souches des entérobactéries après 48h d'incubation pour le disque et pour 2 souches de *K. pneumoniae* N°24 et N°58 pour le E-test .

Notre étude confirme bien que l'Ertapénème est un marqueur sensible pour la détection des entérobactéries productrices des carbapénémases notamment de type OXA-48. Il paraît aussi intéressant de voir, grâce aux résultats de notre étude, quelles méthodes phénotypiques peuvent être utilisées pour suspecter des souches comme produisant une carbapénémase , avant la confirmation par une méthode génotypique.

Alors, c'est donc bien la méthode biochimique de carba NP test qui s'avère être la méthode phénotypique à la fois la plus sensible et la plus rapide (la lecture après 2H) et possède aussi une excellente spécificité (**Dortet, L., et al., 2012 , Dortet, L., et al., 2013**) le résultat de ce test a été positif pour 2 *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae* N°24 et N°58),en plus une autre méthode a été aussi utilisée , le test de Hodge modifié qui montre des résultats positifs pour 6 souches parmi les 20 souches (*Enterobacter cloacae* N°12 et N°6 , *Klebsiella pneumoniae* N°24 , N°58 et N°5, *Serratia marcescens* N°8). Les résultats de notre étude concernent les méthodes phénotypiques similaire à plusieurs études qui ont utilisé ces méthodes pour la confirmation de la présence des entérobactéries productrices des carbapénémases (**Jolivet-Gougeon, A., 2011 ; Essayagh, T., et al., 2012 ; Girlich, D., et al., 2012 ; Nordmann , P., et al., 2013 ; Riethmuller, J., 2013 ; Dortet., L.2, et al., 2014 ; Mennane, Z., et al., 2016**).

Avec ces deux méthodes, il peut donc être suggéré d'utiliser la méthode manuelle de diffusion en gélose sur Mueller Hinton avec un disque d'Ertapénème afin d'optimiser le délai de rendu des résultats pour une souche suspectée d'être productrice des carbapénémases .Au vu des résultats de notre étude, il peut être proposé d'utiliser, en association, les deux méthodes phénotypiques (Carba NP test et Hodge test) et la méthode manuelle avec un disque d'Ertapénème. Sur la base de notre travail, cette association aurait permis une détection de toutes les souches des entérobactéries suspectées avec un délai de 2h et au maximum 24h.

Concernant les autres antibiotiques , nos résultats ont indiqué que la majorité des entérobactéries étaient résistantes à l'Amoxicilline et l'Amoxicilline +Acide clavulanique . Cette résistance est due à la production de céphalosporinase chromosomique. Les taux de résistance au céfoxidine pour les entérobactéries varie entre (25% et 80%) avec sensibilité totale pour *Citrobacter* spp., *Morganella morganni* et *Providencia* spp., pour cefotaxime entre (16% et 75%), pour ceftriaxone entre(25% et 80%) avec sensibilité totale pour *Citrobacter* spp., *Morganella morganni*, pour l'Aztreonam entre (8% et 62%) sauf *Citrobacter* spp., *Morganella morganni* , et *Providencia* spp., nos résultats sont similaires au résultats du (**Leotard, S., Negrin, N., 2010**). Ces taux de résistance sont expliqués par la production de BLSE grâce à l'observation de bouchon de champagne ou entonnoir dans le test de synergie chez 70 souches sur 186 (37,6%) (30 *Klebsiella* spp., 20 *Escherichia coli* ,6 *Enterobacter* spp. , 4 *Proteus* spp., 6 *Serratia* spp., 1 *Morganella morganii* , 2 *Providencia* spp. , 1 *Citrobacter* spp.).

Selon le 15^{ème} Rapport (De Janvier à Décembre 2014) de la Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN), parmi 8289 enterobactéries isolées en milieu hospitalier, 2790 souches sont productrices de BLSE (33,6%) (**AARN, 2016**) et 32,69 % selon le 14^{ème} Rapport (**AARN, 2015**)

Une multirésistance aux autres antibiotiques est également observée pour les entérobactéries résistantes aux B-lactamines , La ciprofloxacine et les aminosides ont montré également une très bonne activité (ciprofloxacine entre 6% et 66%, Gentamicine entre 8% et 57% et Amikacine entre 8 % et 37 %) . Cependant plusieurs publications ont rapportées des taux de résistance variables à ces molécules : 55% des souches sont résistantes à la ciprofloxacine dans 1 étude rapportée par (**Guessennd, N., et al., 2008**), 14% rapportés par Thabet (**Thabet, L ., et al., 2010**) pour les aminosides.

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

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie présente dans l'environnement et peut ainsi coloniser facilement un site de prélèvement. En milieu hospitalier, les conditions de réanimation des patients, soumis à des gestes invasifs multiples et dont les défenses immunitaires sont altérées, favorisent le déclenchement d'infections patentées à cette bactérie opportuniste, dont la mortalité est très élevée. Cette gravité est liée en grande partie à la résistance aux antibiotiques (**Philippon, A., 1998**) de cette espèce, laissant au clinicien un choix limité d'antibiotiques efficaces.

Les résultats de notre étude ont montré que toutes les souches de *P. aeruginosa* ont une résistance élevée allant jusqu'à 100% presque à tous les antibiotiques testés à l'exception de la colistine (0%). Ces résultats expliquent la relation entre l'utilisation abusive des antibiotiques en milieu hospitalier et la dissémination des souches multirésistantes. Au cours des deux dernières décennies, l'augmentation de la prévalence des infections à *P. aeruginosa* multirésistants (PAMR) a été rapportée par plusieurs centres hospitaliers à travers le monde (**Babay, H., 2007 ; Patzer, J. A., et al., 2007 ; Ben Slama, K., et al., 2011 ; Touati, M, 2013 ; Chinbo, M., et al., 2014**). En l'absence de nouvelles thérapeutiques efficaces contre cette espèce dans un futur proche, la surveillance périodique de l'épidémiologie locale et de l'état de résistance aux antibiotiques est fondamentale pour guider le choix d'une antibiothérapie probabiliste appropriée (**Karlowsky JA., et al., 2003**).

La résistance à l'Imipénème a été aussi confirmée par E-test (résultat positif pour toutes les souches), cette résistance est souvent liée à une perte de la porine D2 (OprD) et couplée à une faible hydrolyse par la céphalosporinase périplasmique, soit par production d'une bétalactamase hydrolysant l'Imipénème, peut être expliquée par la forte consommation de l'imipénème dans nos hôpitaux , où ce composé est prescrit pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*.

La réalisation des méthodes phénotypiques (carba NP test , Hodge test et EDTA test) a révélé la présence de 2 *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* ALG- 2 et *P. aeruginosa* ALG-19) productrice de carbapénémase de la classe B d'Ambler (métallo-β-lactamases). Ces méthodes ont été aussi utilisées dans l'étude réalisée par (**Shawn,V., et al., 2013 ; Yusuf, E. , et al., 2014 ; Bakour, S., et al., 2015**)

Depuis 1980, il y a une évolution considérable de la résistance d'*A.baumannii* vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques : on observe une différence significative entre les souches isolés avant 1980 et après 1980 (**Annie, M., et al., 1996**), la résistance touche :

les bêta lactamines à large spectre, les aminosides et les fluoroquinolones (**Chbani, F., et al., 2004 ; Picazo , JJ., et al., 2006 ;**).

Notre étude à montré une multirésistance d'*A. baumannii* aux différents antibiotiques, ainsi la molécule la moins efficace de notre étude, est l' Aztreonam 71,8% , suivit de 100% aux (Ticarcilline-acide clavulanique, la Céftazidime, l'Imipénème, l'Amikacine, la Gentamicine, la Ciprofloxacine, la Trimethoprime/ sulfamethoxazole, Fosfomycine, et la Rifampycine) et une sensibilité totale à la colistine, la résistance à l' Imipénème a été confirmée par E-test qui montre des résultats positifs pour toutes les souches . Nos souches restent plus résistantes que des souches isolées en Maroc entre 2003 et 2005 (91 % à la Céfotaxime, 50,3 % à la Ceftazidime et 42,6 % à l'Imipénème, les Aminosides varient de 17,9 % pour la Nétilmicine à 72,1 % pour la Gentamicine, la Ciprofloxacine était de 65,8 % et au Triméthoprime-sulfaméthoxazole de 75,8 %) (**Lahsoune, M., et al., 2007**), d'autre études en Asie , Europe de l'Est et en Tunisie sont similaires aux résultats de notre étude (**Van Looveren, M., et al., 2004 ; Poirel, L., Nordmann, P., 2006 ; ; Trabelsi, B., et al., 2014**).

Le taux élevé de la résistance aux B-lactamines est du à la production de BLSE ce qui a été confirmé par le test de double disque chez 5 souches d'*A. baumannii* N (1, 4, 5,6,8), le 15^{ème} rapport de l'AARN a détecté 157 *A. baumannii* productrice de BLSE sur l'ensemble de 1153 isolats en milieu hospitalier (**AARN, 2016**), avec pourcentage de 30,53% (149/488) selon le 14^{ème} rapport de l'AARN (**AARN, 2015**).

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

Les méthodes phénotypiques (carba NP test , Hodge test et EDTA test) ont indiqué la présence de 2 *A.baumannii* (*A. baumannii* N°2 et *A. baumannii* N°7) productrices de carbapénémase notamment de la classe B d'Ambler (métallo-β-lactamases). Ces méthodes ont été aussi rapportées dans les publications de (**Lee, K., et al., 2003 ; Gupta, V., et al., 2006 ; Dortet, L ., 2, et al., 2014**).

✓ Etude moléculaire :

L'Algérie est un pays du nord de l'Afrique où les récentes données de la résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance aux b-lactamases notamment dans le nord du pays (**Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Arlet, G.,2014**).

Les infections causées par les bactéries productrices de (BLSE) se traduisent par une mortalité accrue chez les patients hospitalisés (**Marra, A.R., et al., 2006**). Les procédures invasives, l'admission aux unités de soins intensifs, et l'utilisation antérieure d'antibiotiques sont des facteurs de risque les plus courants pour les bactéries productrices de BLSE (**Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005**)

Le résultat de séquençage pour les entérobactéries de notre étude a indiqué la présence de BLSE de type CTX-M : CTX-M-15 dans (*Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia marcescens*), CTX-M-66 (*K. pneumoniae*) et aussi CTX-M-139 (*K. pneumoniae*, *E. coli*), de type TEM-1 (*Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*) et de type SHV : SHV-133,SHV-85,SHV-28,SHV-1(*K. pneumoniae*) (Annexe 3)

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTXM-1) (**Thomson, K.S., Moland, E.S., 2000**), par la suite dans le début des années 90, une diffusion massive des souches productrices de CTX-M (*S. enterica*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *E. aerogenes*) ont été décrites en Argentine et dans les pays voisins, impliquant pour la plupart les CTX-M du groupe 2 (**Bonnet, R., 2004, Rossolini, G. M., 2008**) . En 15 ans, la diffusion mondiale des BLSE de type CTX-M chez les entérobactéries a explosé de façon extrêmement rapide, d'où le terme de «pandémie CTX-M» (**Canton, R., 2006**).

CTX-M15 sont mondialement décrites en Asie , Amérique (**Xia, S., et al., 2009 ; Park, S.H., et al., 2012**) , et en Afrique (**Iroha, I.R., et al., 2012**) . Le CTX-M-66 a également été signalé dans deux isolats de *Proteus mirabilis* dans un hôpital universitaire de Taïwan entre 1999-2005 (**Wu, J.J., et al., 2008**). Récemment, plus de 150 variantes CTX-M ont été décrites (<http://www.lahey.org/Studies/>) et ont été classées en 6 groupes phylogénétiques : le groupe CTX-M-1 avec M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29 et 30 ; le groupe CTX-M-2 avec M-4, 5, 6, 7, 20, et Toho-1 ; le groupe CTX-M-8 avec CTX-M-8, CTX-M-40 et CTX-M-63 ; le groupe

CTX-M-9, avec M-13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 27, le groupe CTX-M-25 avec CTX-M-26 et enfin le groupe CTX-M-45.(**Elhani, D., 2012**).

La première β -lactamase plasmidique de type TEM (TEM-1) a été isolée en 1965, en Grèce, à Partir d'une souche d'*E. coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira, d'où la nomination (**Datta , N., Kontomichalou, P., 1965**). De nombreux dérivés de TEM-1/2 (> 150) ont été décrits à ce jour, dont plus de 100 avec un phénotype de BLSE. Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries (**Bradford, P. A., 2001, Paterson, D.L., 2005**) . En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella* Pathologie infectieuse en réanimation *Enterica* et *E. coli* (**Canton, R., 2008**). A noter que certains dérivés de TEM (environ 30) ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux I β L, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (**Bradford, P. A., 2001**) .

Les enzymes BLSE de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond à un gène *bla_{SHV}* de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* (**Brisse, S., Verhoef, J., 2001 ; Haeggman, S., et al., 2004**). Actuellement, plus de 180 variantes SHV ont été décrites (<http://www.lahey.org/Studies/>) .

En Algérie, il apparaît que plusieurs types de BLSE ont été détectés : CTXM , SHV , TEM, VEB ,CMY , DHA (Tableau 32). Ici, dans notre étude nous avons rapporté la première détection de *bla* CTX M-66 (*K. pneumoniae*), *bla* CTX M-139 (*K. pneumoniae*, *E.coli*) et *bla* TEM-1 (*K. pneumoniae*) en Algérie .(Annexe 3)

Le seul gène de BLSE rapporté chez *A. baumannii* dans notre étude est le TEM-1. TEM-1 et TEM-2 étaient décrits comme répandus dans *Acinetobacter* aussi dans l'étude de (**Ramoul, A., et al., 2013**), (**Khorsi, K., et al., 2015**) et de (**Bouguenoun,W., et al., 2016**). En outre, *bla_{TEM-1}* gène a été trouvé aussi en Danemark (**Tan, S. Y., et al., 2013**)

Tableau N°32: Présentation des β -lactamases décrites en Algérie jusqu'à 2016

Espèce	Enzyme décrit	Lieu	Référence
<i>Enterobacteriaceae</i>	CTX-M-3,CTX-M-15	Béjaia	Touati, A., et al., 2006
	CTX-M-15,SHV-12,CMY-2,DHA-1	Alger	Iabadene,H.1 , et al.,2009
	CTX-M-28	Annaba	Meradi, L., et al., 2011
	CTX-M-15	Alger	Touati,A., et al., 2012
	CTX-M-15,SHV-12, SHV-11	Annaba	Ramoul, A., 2014
<i>Klebsiella spp.</i>	CTX-M-3,CTX-M-15,SHV-12,DHA-1	Annaba	Nedjai, S., et al., 2012
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-15	Touati, A., et al., 2007
		CTX-M-15	Touati, A., et al., 2012
		CTX-M-3,CTX-M-15	Messai,Y., et al., 2008
		CTX-M-15	Touati,A., et al., 2010
	CTX-M-3,CTX-M-15,SHV-98,SHV-99,SHV-100	Alger	Ramdani-bouguassa,N., et al., 2011
	CTX-M-3,CTX-M-15	Béjaia	Gharout-sait, A., et al., 2012
	CTX-M-15	Tlemcen	Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., et al., 2012
	CTX-M-3,CTX-M-15	Tlemcen	Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., et al., 2013
	CTX-M-15,SHV- 12,SHV-28,SHV-110	Inconnu	Berrazeg, M., et al., 2013
	CTX-M-38,CTX-M-15,SHV-133,SHV-1,SHV-11, SHV-12,SHV-33,SHV-28, SHV-1a ,SHV-32,SHV-26, SHV-2a	Annaba	Belbel, Z., et al., 2014
	CTX-M-15,SHV-12,SHV-11,SHV-32, SHV-28,SHV-133	Annaba	Labid, A., et al., 2014
	CTX-M-15, CTX-M-139, CTX-M-66,SHV-133,SHV-85,SHV-28, SHV-1,TEM-1	Annaba,Skikda, Guelma	Notre étude: Mellouk, F.Z., et al., 2017
	CTX-M-15,SHV-98,TEM-141	Guelma	Bouguenoun,W., et al., 2016

<i>E. coli</i>	CTX-M-3,CTX-M-15	Alger	Ramdani-Bouguessa, N., et al., 2006
	CTX-M-15	Béjaia	Touati, A., et al., 2007
	CTX-M-15	Tlemcen	Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., et al., 2012
	CTX-M-3,CTX-M-15	Béjaia	Gharout-siat, A., et al., 2012
	CTX-M-3,CTX-M-15	Tlemcen	Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., et al., 2013
	TEM-1	Annaba	Labid, A., et al., 2014
	CTX-M-15, TEM-1	Annaba	Sassi A., et al., 2014.
	CTX-M-15, CTX-M-139,TEM-1	Annaba,Skikda, Guelma	Notre étude: Mellouk, F.Z., et al., 2017
	CTX-M-15	Guelma	Bouguenoun,W., et al., 2016
<i>Enterobacter spp.</i>	TEM-1, CTX-M-15	Constantine, Annaba, Skikda	Khennouchi ,N.C., et al., 2015
	CTX-M-3,CTX-M-15,SHV-12,DHA-1	Annaba	Nedjai, S., et al., 2012
	CTX-M-15	Alger	Touati,A., et al., 2012
	CTX-M-15	Béjaia	Touati,A., et al., 2008
	CTX-M-3,CTX-M 15,SHV-12,VEB-1	Alger, Tizi-ouzou, Tlemcen	Iabadene,H., et al.,2008
	CTX-M-15	Inconnu	Touati,A., et al., 2010
	CTX-M-15	Tlemcen	Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., et al., 2012
	CTX-M-3,CTX-M-15	Béjaia	Gharout-sait, A., et al., 2012
	CTX-M-3,CTX-M-15	Tlemcen	Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., et al., 2013
	TEM, CTX-M,SHV,DHA	Annaba	Nedjai, S., et al., 2013
	TEM-1, CTX-M-15	Annaba,Skikda, Guelma	Notre étude: Mellouk, F.Z., et al., 2017
	CTX-M 15,SHV-12,TEM-1,TEM-198	Guelma	Bouguenoun,W., et al., 2016

<i>Serratia spp.</i>	CTX-M-3,CTX-M-15,SHV-12,DHA-1		Annaba	Nedjai, S., et al., 2012
	<i>S. marcescens</i>	CTX-M-15, TEM-1, TEM-72,SHV-2a, PER-2	Constantine, Annaba, Skikda	Batah, R., et al., 2015
		CTX-M-15	Annaba,Skikda, Guelma	Notre étude : Mellouk, F.Z., et al., 2017
<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus mirabilis</i> : CMY-12		Constantine	Decré, D., et al., 2002
	<i>Proteus vulgaris</i> : PER-1		Alger	Iabadene, H.2 , et al., 2009
<i>Providencia stuartii</i>	VEB-1		Alger	Aubert D, et al., 2005
	PER-1		Alger	Iabadene, H.2 , et al., 2009
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Salmonella senftenberg</i> : CMY-2		Inconnu	Koeck, J.L., et al., 1997
	<i>S. enterica</i>	CTX-M-3	Constantine	Naas T., et al., 2005
		CTX-M-15	Inconnu	Touati, A., et al., 2010
		CTX-M-14	Tizi-ouzou	Iabadene, H.2 , et al., 2009
		CTX-M-3	Constantine	Naas T., et al., 2009
		CTX-M-15	Constantine	Naas T., et al., 2011
	CTX-M-15, TEM-4, TEM-48, TEM-188		Alger	Kermas, R., et al., 2012
	<i>Salmonella non-typhi</i> : CTX-M-15		Annaba	Bouzidi, N., et al., 2011
<i>A. baumannii</i>	TEM-1		Annaba	Ramoul, A., et al., 2013
	TEM-128		Annaba	Touati, M., et al., 2013
	TEM-1		Alger	Khorsi, K., et al., 2015
	TEM-1		Annaba	Notre étude : Mellouk, F.Z., et al., 2017
	TEM-1		Guelma	Bouguenoun, W., et al., 2016

Le résultat de PCR et de séquençage de notre étude concernant les carbapénèmases a révélé la présence de type OXA-48 dans les entérobactéries précisément dans deux souches de *K. pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae* N°24 et N°58) résistantes à l'Ertapénème (Annexe 3)

Les carbapénèmases enzymes ont été largement rapportés dans les entérobactéries dans le monde entier. Actuellement, il se trouvent principalement dans *K. pneumoniae* , *E. coli* et dans d'autres

espèces des entérobactéries, avec une prévalence plus élevée en Europe du Sud et en Asie que dans d'autres parties du monde (**Djahmi, N., et al., 2014**).

Le carbapénémase de Classe D , connu aussi comme *bla_{OXAs}* pour l'oxacillinas, a été détecté dans de nombreuses bactéries Gram-négatif, y compris les entérobactéries. Le gène *bla_{OXA-48}* a été initialement identifié dans *K. pneumoniae* isolé en Turquie (**Nordmann, P., L. Poirel. 2014**). Depuis lors, l'apparition de *bla_{OXA-48}* producteurs comme la source des épidémies nosocomiales dans de nombreuses régions du monde, notamment dans les pays méditerranéens: Croatie, Égypte, France, Grèce, Israël, Italie, Lebanon, Libye, Slovénie, Espagne, Tunisie, Maroc et Turquie (**Djahmi, N., et al., 2014**).

En Algérie, depuis le début de 2010, les carbapénémases de la classe D OXA-23 et OXA-58 type ou de classe B type, y compris VIM-19 enzyme, ont été considérés comme les premières carbapénémases détectés chez les bacilles à Gram négatif , la première carbapénémase décrite dans les entérobactéries était VIM-19 en 2010, par Robin, et al. chez 5 souches des entérobactéries : 1 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 2 *Providencia stuarti* (**Robin F., et al., 2010**) . Par la suite, la détection de KPC a été rapportée pour la première fois en 2010 par **Vaux et al.** chez les entérobactéries (**Vaux S., et al., 2011**) , par la suite Bakour et al. ont décrit la détection de KPC-3 chez *Klebsiella pneumoniae* dans la ville de Sétif à partir de liquide céphalo-rachidien d'un enfant (**Bakour, S., et al., 2015**). Récemment, Sassi et al. en 2014 nous présentent le premier cas autochtone des infections causées par *bla_{NDM-5}* (New Delhi metallo-bêta-lactamase) produisant *E. coli* récupérées à partir d'urine et de sang spécimens de trois patients dans la ville d'Annaba entre Janvier 2012 et Février 2013 (**Sassi A., et al., 2014**). (Tableau 33)

L' Oxacillinase de type OXA-48 a été identifié chez les entérobactéries en 2010(**Vaux, S., et al., 2011**) , ensuite à Constantine la détection d' *E.coli* productrice de *bla_{OXA-48}* a été déclarée à partir d'un patient provenant d'une province frontalière avec la Tunisie (**Agabou, A., et al., 2014**) . *K. pneumoniae* productrice de *bla_{OXA-48}* a été aussi détectée à Alger en 2014 (**Aggoune,N., et al., 2014**) , à Constantine en 2015 (**Cuzon, G., et al., 2015**). Aussi à Guelma la détection des souches de *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* productrice de *bla_{OXA-48}* (**Bouguenoun,W., et al., 2016**) (Tableau 33) (Figure 69).

Dans notre travail, nous décrivons la première détection de OXA-48 produite par *K. pneumoniae* dans deux villes (Annaba et Skikda) dans l'est de l'Algérie. Ces résultats indiquent la propagation du gène *bla_{OXA-48}* aux différentes régions d'Algérie.

En Algérie, il y a peu de publications sur la détection de l'OXA-48 enzyme. Régulièrement dans les laboratoires hospitaliers, on l'utilise plus fréquemment l'Imipénème pour la détection de l' OXA-48 que les autres carbapénèmes tels que l'Ertapénème, mais cette enzyme confère une résistance de haut niveau pour la plupart des composés des β -lactamines tels que les pénicillines et les céphalosporines, et variable effet pour les carbapénèmes (Poirel, L., et al., 2012) . Cela a été confirmé par notre étude, la détection de deux *K. pneumoniae* productrices de l' OXA-48 , qui étaient résistantes à l'Ertapénème et sensibles à l'Imipénème.

Pour *P. aeruginosa* , Dans cette étude, seuls deux *P. aeruginosa* hébergent le gène *blaVIM-4* (ALG-19 de Annaba au niveau du service des Brûlés (GenBank no KT698096) et l'autre ALG-2 de Skikda au niveau du service de pédiatrie (GenBank accession no KT698097) ont été détectées (Annexe 4).

Plusieurs types de Metallo β -lactamases (MBL) ont été décrites dans le monde entier dans les souches de *P. aeruginosa* (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, FIM et NDM) (Sefraoui, I. ,et al., 2014). Les plus fréquents sont les types de VIM. Ceux-ci ont été identifiés dans les isolats résistants aux carbapénèmes de *P. aeruginosa* dans les pays européens avec des côtes sur le bassin méditerranéen: l'Italie, la France, la Grèce, l'Espagne, la Croatie et la Turquie, ainsi que des pays africains: la Tunisie, Kenya, Libye, Sud Afrique (Sefraoui, I. , et al., 2014), et Liban (Al-Bayssari, C., et al., 2014).

Le gène *blaVIM-4* a été détecté pour la première fois en *P. aeruginosa* de Thessalie (Larissa, Grèce), cette détection a été suivie d'une épidémie dans cette institution (Pournaras, P., et al. ,2002 ; Pournaras, S., et al., 2003) , dans une autre étude, *blaVIM-4* a été rapporté par Libisch et al en Hongrie (dans sept hôpitaux)(Libisch, B., et al., 2006) , en Suède (Giske, C.G., et al., 2003), en Pologne (Patzer, J., et al., 2004), au Canada (Mataseje, L.F., et al., 2012) , et en France (Castanheira, M., et al., 2014) (Figure 70).

En Algérie, seul le gène *blaVIM-2* a été identifié par Touati et al. à Annaba (Touati, M., et al., 2013) et Sefraoui et al. à Oran (Sefraoui, I. , et al., 2014) (tableau 33) (Figure 69). Ensuite à Annaba Meradji et al ont décrit la détection de gène *bla VIM-4* chez des souches clinique de *P. aeruginosa* (Meradji, S., et al., 2016) . Notre étude rapporte la première détection de *blaVIM-4* chez *P. aeruginosa* dans deux villes Algériennes : Annaba et Skikda .

Suite à cette découverte, nous avons soumis les séquences VIM-4 de 2 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'Imipénème à la base de données de GenBank sous le numéro

d'adhésion **KT698096** et **KT698097**. Les informations concernant ces souches sont enregistrées dans la base de données de GenBank au nom du premier auteur de cette étude.

Selon le traitement des résultats de séquençage pour l'OprD, *P. aeruginosa* résistance à l'Imipénème sont classés en 5 groupes (G1, G2, G3, G4, G5) selon plusieurs types de mutations résultat en un codon stop, Ces résultats indiquent que l'inactivation mutationnelle du gène OprD était le principal mécanisme de la résistance à l'Imipénème chez *P. aeruginosa*, comme précédemment décrit (**Sefraoui, I., et al., 2014 ; Al-Bayssari, C., et al., 2014**).

Fait intéressant, la recherche dans PubMed ne donne aucun rapport publié sur la co-expression de *bla_{VIM-4}* et l'OprD porine dans des souches cliniques de *P. aeruginosa* en Afrique du Nord. Ici nous rapportons la première co-expression de *bla_{VIM-4}* et OprD en *P. aeruginosa* dans 2 villes du l'est de l'Algérie : Annaba et Skikda.

Deux souches d'*A. baumannii* productrices de *bla_{NDM-1}* ont été rapportées dans notre étude (*A. baumannii* N°2 et *A. baumannii* N°7) et cinq souches hébergent l' OXA-23, *A. baumannii* N (1, 4, 5,6,8). (Annexe 4)

La large diffusion des carbapénèmes chez *A. baumannii* constitue une menace sur la santé publique mondiale. La caractérisation moléculaire des mécanismes et de l'épidémiologie de la multirésistance est une étape principale pour lutter contre sa propagation et de développer des stratégies thérapeutiques. (**Khorsi, K., et al., 2015**).

Les enzymes MBLs les plus décrites chez *A. baumannii* sont les variantes de type IMP, VIM, SIM, et NDM (**Zarrilli, R., et al., 2013 ; Tang, S.S., et al., 2014**). La première variante détectée était IMP-2 en 2000 en l'Italie, suivi de l'IMP-4 détectée à Hong Kong (**Zarrilli, R., et al., 2013**). L'NDM, d'abord trouvée dans *K. pneumoniae* est maintenant répandue dans *A. baumannii* en Inde (**Karthikeyan, K., et al., 2010**), puis elle a été retrouvée en Allemagne, Belgique, Bangladesh, Chine et en République tchèque.

En Algérie, la carbapénémase de classe B NDM-1, est la première carbapénémase identifiée chez *A. baumannii* à partir des patients algériens transférés en France (**Boulanger, A., et al., 2012**) et en Belgique (**Bogaerts, P., et al., 2012**). Par la suite, cette enzyme a été rapportée dans l'ouest d'Algérie (**Mesli, E., et al., 2013**), à Sétif et Alger (**Bakour, S., et al., 2014**) (Tableau 33) (Figure 69). Notre étude, est le premier résultat, montrant le début de la propagation de cette enzyme dans la région d'Annaba et de Skikda.

L'oxacillinases, de type OXA-23 a été la première enzyme détectée en Algérie dans *A. baumannii*. Par la suite, les différents groupes de l'oxacillinase (OXA-24/72 et OXA-58) ont été décrits (tableau 32) (Figure 69). Dans la présente étude, cinq *A. baumannii* a produit l'enzyme OXA-23, qui est devenue endémique en Algérie.

Dans le monde l'OXA-23 enzymes ont été identifiées dans *A. baumannii* dans diverses parties du monde : Brésil (Dalla-Costa, L., et al., 2003), Chine (Yu, Y.S., et al., 2004), Londres (Coelho, J.M., et al., 2004) et Singapour (Koh, T.H., et al., 2007).

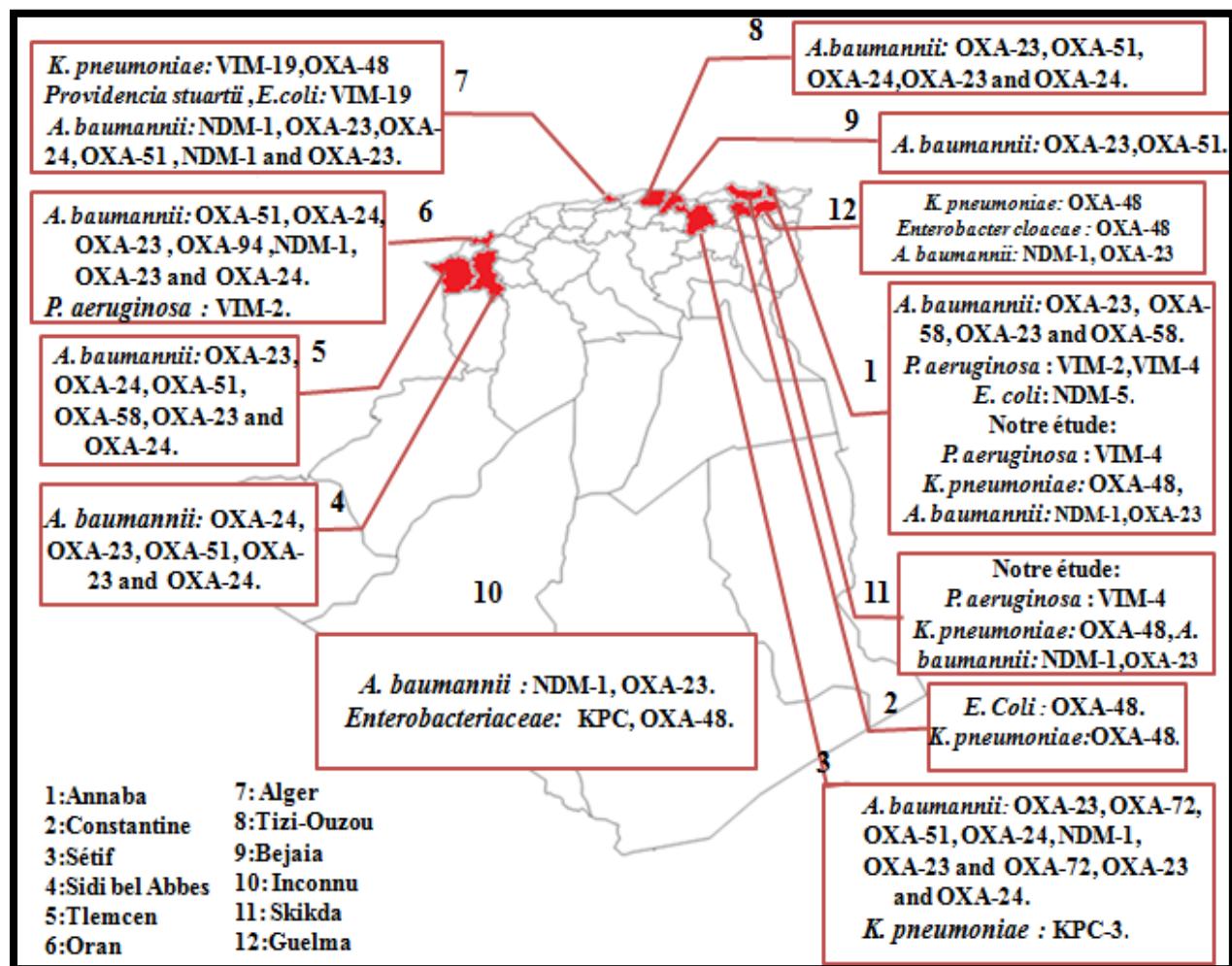


Figure N°69 : Carbapénèmases décrites dans des souches cliniques des bactéries à Gram négatif de l'Algérie (Mellouk, F.Z., et al., 2017)

Tableau N°33 : Carbapénèmases détectées dans des souches cliniques dans différentes villes de l'Algérie (Mellouk, F.Z., et al., 2017)

Espèce	Enzyme décrit	Nombre des souches	Année	Localisation	Référence
<i>Enterobacteriaceae</i>	KPC	1	2010	Inconnu	Vaux, S., et al., 2011
	OXA-48	1			
	VIM-19	1	2010	Alger	Robin, F., et al., 2010
<i>E. coli</i>	NDM-5	3	2014	Annaba	Sassi, A., et al., 2014
	OXA-48	1	2014	Constantine	Agabou, A., et al., 2014
	VIM-19	2	2010	Alger	Robin, F., et al., 2010
	OXA-48	1	2014	Alger	Aggoune, N., et al., 2014
	KPC-3	1	2015	Sétif	Bakour, S., et al., 2015b
<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	1	2015	Constantine	Cuzon, G., et al., 2015
	OXA-48	2	2015	Annaba, Skikda	Note étude: Mellouk, F.Z., et al., 2016
	OXA-48	2	2015	Guelma	Bouguenoun, W., et al., 2016
<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48	1	2015	Guelma	Bouguenoun, W., et al., 2016
<i>Providencia stuartii</i>	VIM-19	2	2010	Alger	Robin, F., et al., 2010
	VIM-2	14	2013	Annaba	Touati, M., et al., 2013
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	2	2014	Oran	Sefraoui, I., et al., 2014
	VIM-4	2	2015	Annaba, Skikda	Note étude: Mellouk, F.Z., et al., 2017
	VIM-4	6	2015	Annaba	Meradji, S., et al., 2016

A.baumannii	OXA-58	16	2010	Tlemcen	Drissi, M., et al., 2010
	OXA-23	1	2010	Inconnu	Mugnier, P.D., et al., 2010
	NDM-1	1			
	OXA-94	1	2012	Oran	Boulanger, A., et al., 2012
	NDM-1	1	2012	Inconnu	Bogaerts, P., et al., 2012
	OXA-23,	22			
	OXA-58	1	2012	Annaba	Touati, M., et al., 2012
	OXA-23 and OXA-58	1			
	OXA-23 and OXA-72	2	2012	Sétif	
	OXA-23	29			
	OXA-24	5			Bakour, S., et al., 2012
	OXA-23	2	2012	Tizi-Ouzou	
	OXA-51	71	2012	Sétif and Tizi-Ouzou	
	OXA-23	40		Tlemcen,	
	OXA-24	3	2012	Sétif, Sidi bel Abbes, oran,	Kempf, M., et al., 2012
	OXA-23 and OXA-24	3		Tizi-Ouzou	
	OXA-24,	17	2013	Tlemcen,	
	OXA-23	40		Sidi bel Abbes, oran	Mesli, E., et al., 2013
	NDM-1	5	2013	Oran	
	OXA-51	47	2014	Sétif, Alger, Bejaia	
	OXA-23	33	2014	Alger, Bejaia	Bakour, S., et al., 2014
	OXA-24	10	2014		
	NDM-1 and OXA-23	7	2014	Alger	
	NDM-1	4	2014	Sétif	
	OXA-51	94			
	NDM-1	10	2015		
	OXA-24	19		Alger	Khorsi, K., et al., 2015
	OXA-23	63			
	NDM-1	2	2013	Annaba,	Note étude: Mellouk, F.Z., et al., 2017
	OXA-23	5	2013-2014	Skikda	
	NDM-1	2	2014	Guelma	Bouguenoun, W., et al., 2016
	OXA-23	1	2014		

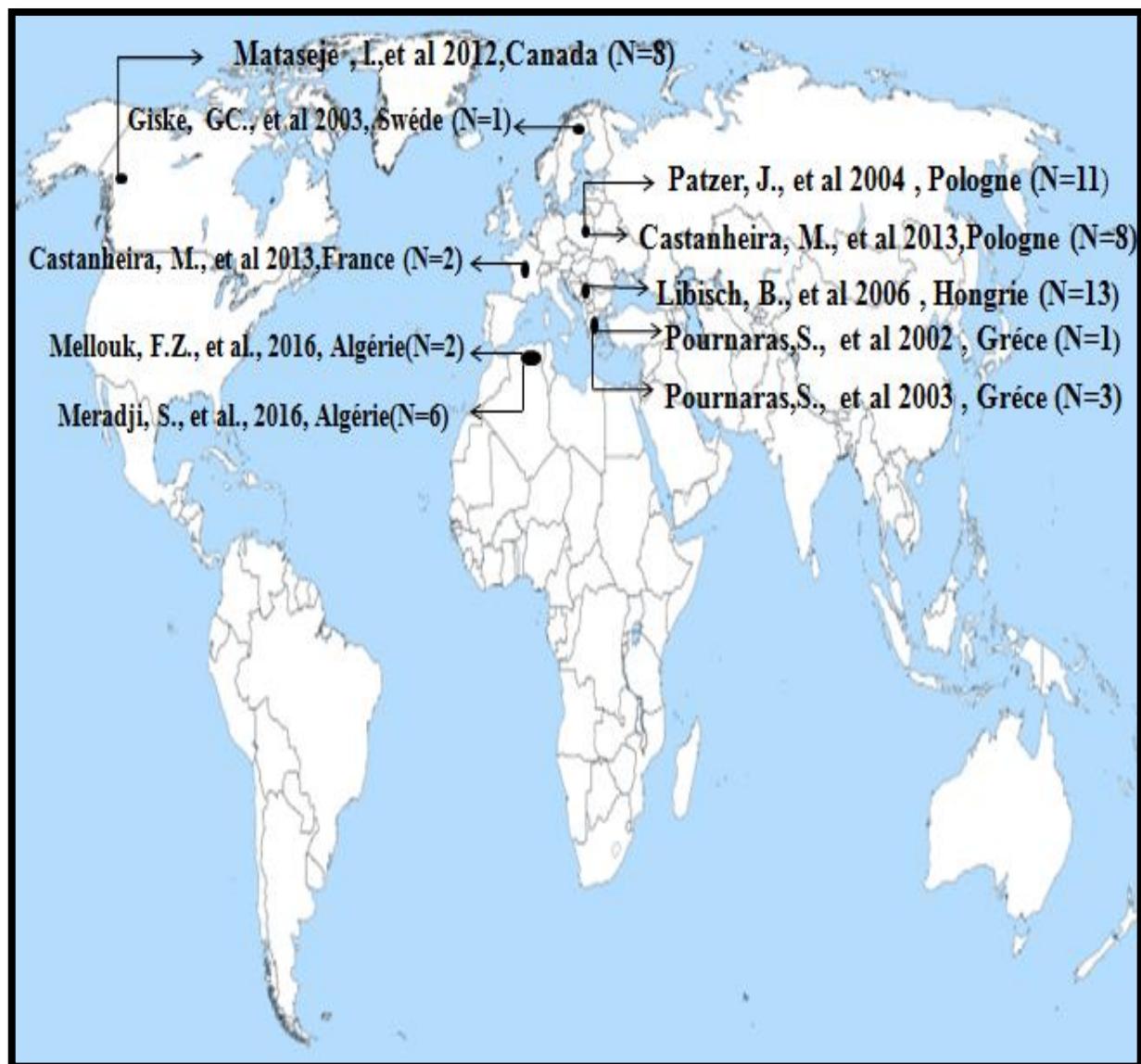


Figure N°66 : Propagation mondiale de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de VIM-4
(Mellouk, F.Z., et al., 2017)

✓ **Le typage moléculaire:**

Le typage génomique de *K. pneumoniae* a été réalisé par le *multi-locus sequence type* (MLST) les 2 souches de *K. pneumoniae* N°24 et N°58 résistantes à l'Ertapénème , a révélé que celles-ci appartiennent à deux clones différents ST 404 et ST 219 (Annexe 3) . Notre étude a révélé également la première découverte de ST 404 et ST 219 en Algérie chez *K. pneumoniae*.

Le clone ST 404 a été aussi rapporté parmi les clones épidémiques selon la publication de **Kim, et al** en Korea chez les souches de *K.pneumoniae* productrice de carbapénémase (**Kim, Y.A., et al., 2012**).

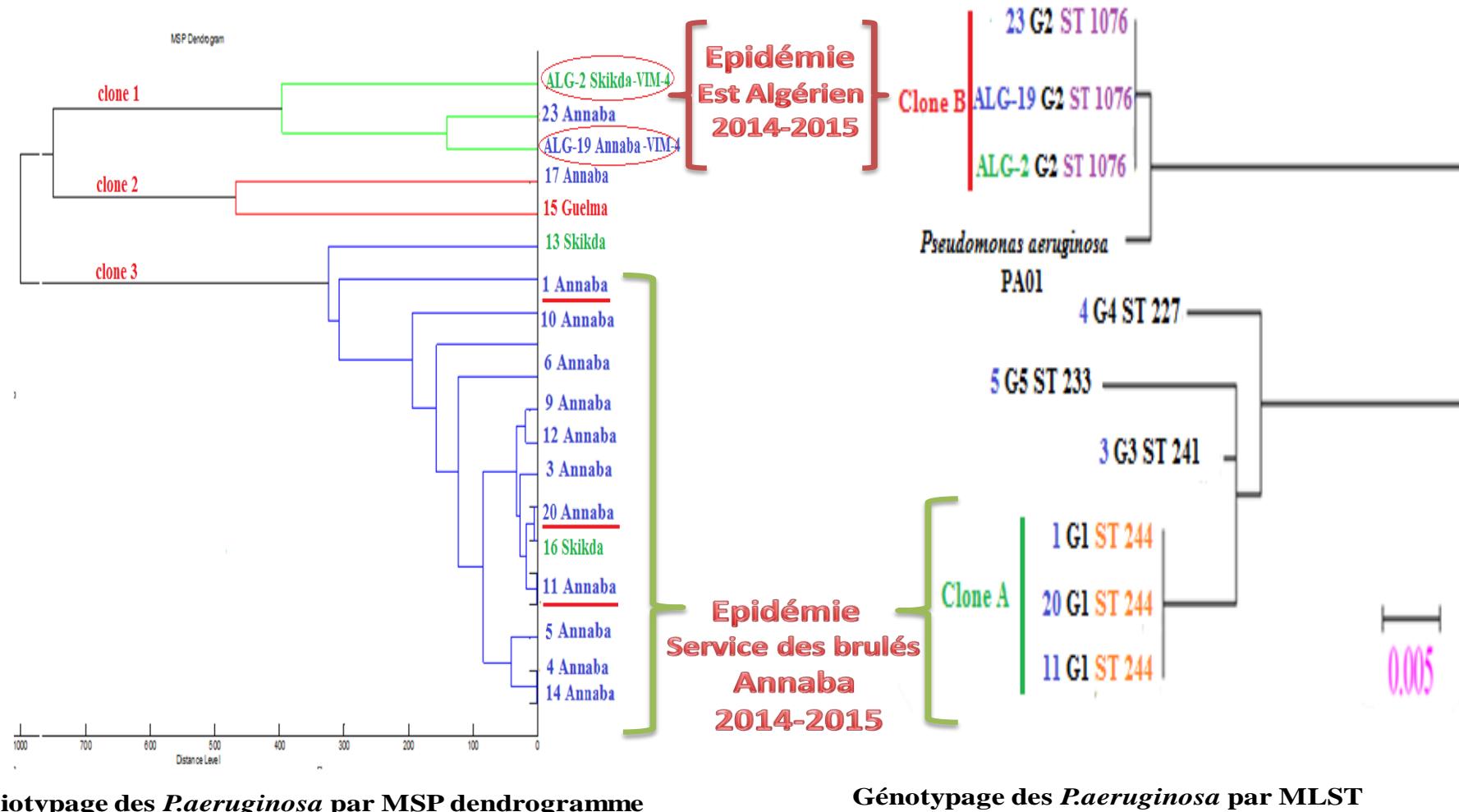
En 2015, Andrade Leonardo a présenté son Résumé sur le thème “International clones (ST11/340/252, ST15, ST101), epidemic plasmids (IncFIIk, IncR, IncL/M) and virulence factors associated with CTX-M(-15, -8, -2) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil ” lors du 25^{ème} Congrès européen de microbiologie clinique et des maladies infectieuses à Copenhague, au Danemark, qui montre la détection de ST 219 chez *K.pneumoniae* productrice de *bla* _{KPC-2} (**Andrade, L., et al., 2015**).

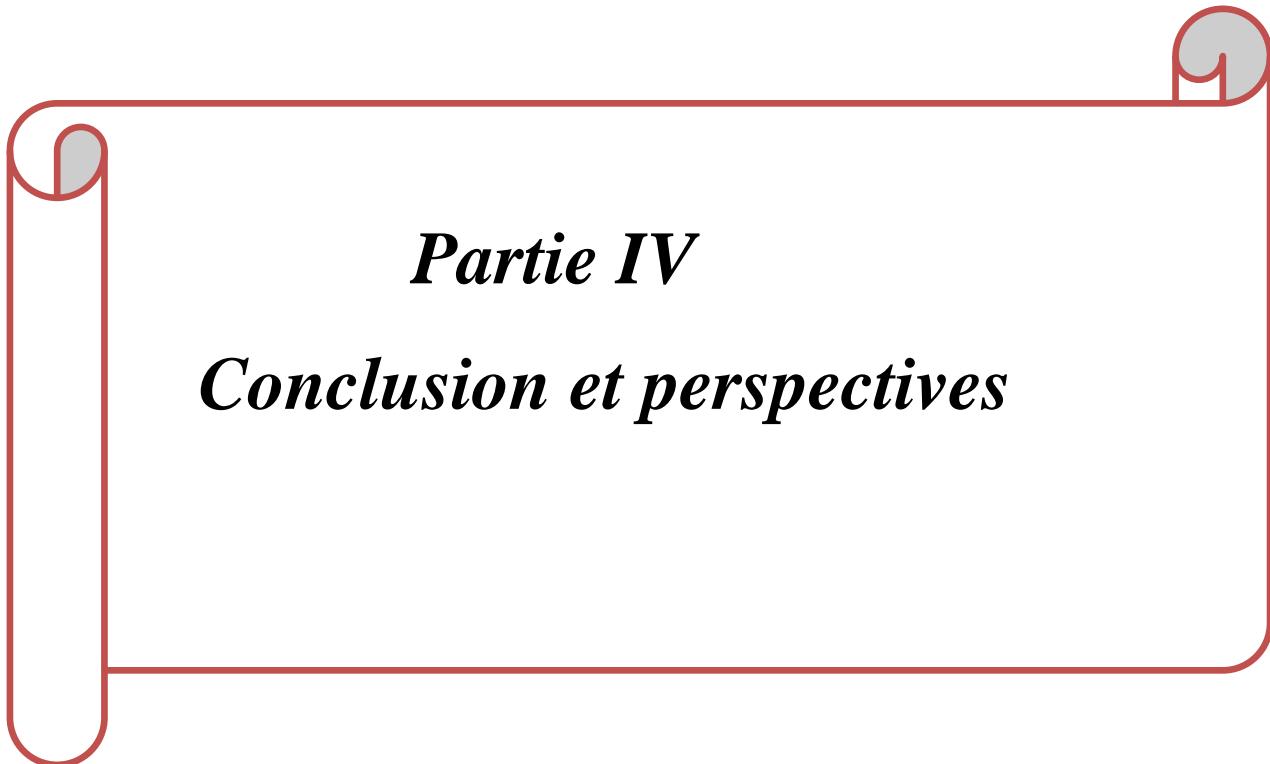
Pour *A. baumannii* , 2 clones ST 2 et ST 85 ont été observés par le MLST, ces clones ont été découverts par Bakour et al., dans leur étude l'analyse a montré que ST2 était le clone le plus commun (10/12 isolats). Ce clone a été associé à la production d'enzymes de type OXA (OXA-23 ou OXA-24). Les deux autres *A. baumannii* produisant métallo-β-lactamase enzyme, NDM-1, appartiennent à ST85 .

C'est ce qui suggère que ST2 et ST85 clones hébergeant le *bla* _{OXA-23}, *bla* _{OXA-24}, et *bla* _{NDM-1} gènes continuent à circuler dans les hôpitaux de l' Algérie (**Bakour, S., et al., 2015**).

Le MLST pour *P. aeruginosa* a révélé que ces souches appartenaient à différentes séquences types (ST244, ST1076, ST 241, ST 227 and ST233) (Annexe 4) . les résultats de ce travail sont cohérents dans cinq pays du bassin Méditerranéen (**Maatallah, M., et al., 2011**) . Les ST1076 et ST244 clones étaient le plus souvent, en accord avec les études menées par Sefraoui et al. en Algérie (**Sefraoui, I. , et al., 2014**) et Al-bayssari et al. au Liban (**Al-Bayssari, C., et al., 2014**)

A partir de l'analyse de l'arbre phylogénétique de *P. aeruginosa* et le biotypage par le MALDI-TOF MSP dendrogramme , nous avons identifié 2 clones : clone A du ST 244 appartient au groupe 1(G1) de L'OprD qui comprend 3 souches isolées au niveau du service des Brûlés à l'hôpital Iben Sina Annaba , ces souches appartiennent aussi au clone 3 de la dendrogramme, ce qui suggère qu'une épidémie due à la dissémination de le clone ST244 de *P. aeruginosa* avait eu lieu au cours de l'année 2014-2015 au sein de ce service, et le clone B du ST 1076 appartient au groupe 2(G2) de L'OprD qui comprend 3 souches :2 souches isolées au niveau du service des Brûlés à l'hôpital Iben Sina Annaba et 1 souche isolée au niveau du service de pédiatrie à l'hôpital Abderrezak Bouhara Skikda, ces souches sont aussi assemblées dans le clone 1 , suggérant la diffusion d'une épidémie due à ce clone dans l'est algérien (Figure 71)

Figure N°71: Typage des souches de *P.aeruginosa*



Partie IV

Conclusion et perspectives

Conclusion :

L'émergence des bacilles à Gram négatif (BGN) résistantes à de multiples antibiotiques incluant les β -lactamines, aminosides et les quinolones qui comptent parmi les molécules les plus prescrites, en particulier en milieu hospitalier est devenue un problème crucial de la santé publique. Parmi ces antibiotiques l'utilisation des nouvelles β -lactamines, Conduit à l'émergence des bacilles à Gram négatif producteurs des β -lactamases au spectre de plus en plus large (inactivant un nombre de plus en plus important de classes de β -lactamines), comme en particulier les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et plus récemment les carbapénémases.

En fait l'objectif de notre travail a porté sur l'identification et l'évaluation de l'antibiorésistance de 186 BGN : 161 au groupe des entérobactéries et 25 au groupe des bacille à Gram négatif non fermentants, durant la période du mois de Mars 2013 jusqu'au mois de Mars 2015 à partir de trois villes de l'est Algérien, n=114 à Annaba , n=47 à Skikda et n=25 à Guelma .

La détermination des niveaux de la résistance aux antibiotiques pour les BGN , montre une résistance considérablement élevée vis-à-vis les β -lactamines(des bactéries résistantes aux C3G, avec un pourcentage important de la résistance à l'Ertapénème pour les entérobactéries , notamment pour l'*Enterobacter spp.* avec un taux de 46,6 % , *Serratia spp.* 22,2%, *Klebsiella spp.* 20%, et *E. coli* 12,7% , avec sensibilité total à l'Imipénème . 100 % des souches sont résistantes à l'Imipénème pour *A. baumannii* et 50% pour *P. aeruginosa*), les aminosides (varie entre 8% et 57% pour Gentamicine, 8% et 37% pour l'Amikacine concernent les entérobactéries, entre 50% et 100% pour Gentamicine, 44% et 100% pour l'Amikacine concernant les BGN non fermentants), et les quinolones (varie entre 6% et 66% pour la ciprofloxacine concernent les entérobactéries , 38% et 100% pour les BGN non fermentants).

L'étude moléculaire par PCR et séquençage a indiqué la présence de plusieurs gènes de résistance : CTX-M-15, CTX-M-66, CTX-M-139, SHV- 28, SHV- 85, SHV-1, SHV-133 et TEM-1 pour les BLSE et OXA-48, OXA-23, VIM-4, NDM-1 pour les carbapénèmes.

Notre étude rapporte pour la première fois la détection de *blaVIM-4* produisant *P. aeruginosa* et *blaOXA-48* produisant *K. pneumoniae* et d'autres β -lactamases CTXM-66 et CTXM- 139 produisant les entérobactéries dans deux villes de l'est Algérien : Annaba et Skikda .

Notre étude confirme bien que l'Ertapénème est un marqueur sensible pour la détection des entérobactéries productrices des carbapénèmases notamment de type OXA-48. Il paraît aussi intéressant de voir grâce aux résultats de notre étude, quelles méthodes phénotypiques peuvent être utilisées pour suspecter des souches comme produisant une carbapénémase , avant la confirmation par une méthode génotypique

Selon le traitement des résultats de séquençage pour l'OprD, *P. aeruginosa* résistance à l'Imipénème sont classés en 5 groupes (G1, G2 , G3, G4, G5) selon plusieurs types de mutations résultat en un codon stop, Ces résultats indiquent que l'inactivation mutationnelle du gène OprD était le principal mécanisme de la résistance à l'Imipénème chez *P. aeruginosa*.

Grâce à l'utilisation de la technique du MLST afin de rechercher la relation clonale entre les souches, nous avons pu identifier certains clones (ST 404, ST 219 pour *K.pneumoniae* et ST 244 , ST 1076 pour *P. aeruginosa*) responsables d'épidémies au niveau du service des hôpitaux de l'est Algérien .

Finalement, cette étude attire l'attention sur le risque d'émergence et la propagation de carbapénémase qui représente un problème mondial de la santé et souligne la nécessité d'une surveillance adéquate des souches de BGN multirésistantes dans les hôpitaux algériens.

Perspectives :

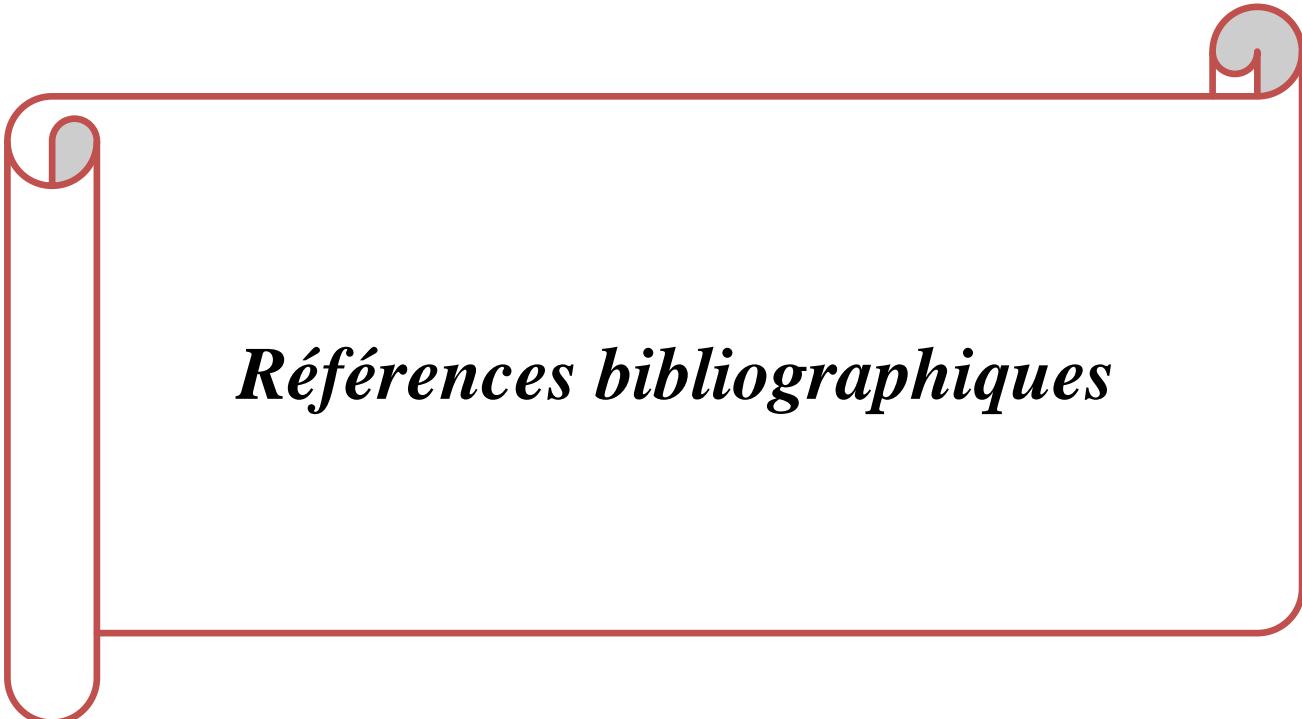
Les souches de BGN multirésistantes nécessitent d'être rapidement et efficacement détectées afin de prendre au plus vite les mesures préventives et thérapeutiques appropriées vis à vis des patients qui les hébergent. Leur détection peut parfois se révéler difficile mais de nouveaux moyens font peu à peu leur apparition afin de faciliter leur mise en évidence au laboratoire de microbiologie.

En plus l'émergence et la propagation des producteurs de carbapénémase limiteront les options thérapeutiques et seront une menace sur la santé publique. La détection rapide, la mise en œuvre de mesures de lutte contre l'infection, la formulation d'une politique d'antibiotiques et des stratégies de prévention pour contrôler la diffusion de ces souches sont requises d'urgence.

En effet, il faut tenir compte du délai de rendu des résultats qui est un critère important pour les cliniciens et hygiénistes respectivement. Actuellement, il faut au moins un délai de 48 heures pour avoir les résultats du laboratoire concernant l'identification et les résultats de l'antibiogramme, durant cette période le patient est traité de façon probable conduisant à l'apparition de souche multirésistante. La situation peut être accélérée par l'identification des agents pathogènes et leur résistance en heures plutôt qu'en jour par l'utilisation des nouvelles méthodes comme la méthode spectrophotométrique, avec par exemple le MALDI-TOF cette technique permet l'identification dans un intervalle de 2heures , permet aussi de détecter tous les types de carbapénémases, cependant même si cette méthode nous permet de dire qu'on est en présence d'une carbapénémase grâce à la dégradation du carbapénème et des éventuels spectres des produits de dégradation des carbapénèmes qu'on peut obtenir, elle ne nous permet en aucun cas de présumer du type de carbapénémase produite par la souche en question.

L'utilisation aussi des nouvelles techniques de biologie moléculaire qui sont des outils puissants et robustes permettent la détection et l'identification des bactéries productrice des carbapénémases . Elles offrent une meilleure sensibilité et spécificité et un gain de temps considérable comparées aux méthodes phénotypiques . Le diagnostic par PCR et le séquençage convient comme test de dépistage simple et rapide avec des sensibilités élevées et des délais d'exécutions rapides. Ainsi, elle peut contribuer à réduire le traitement empirique et peut- être un outil précieux pour l'initiation précoce et le suivi de la thérapie et aussi dans la sélection des souches responsables d'épidémies dans certains services des hôpitaux par la réalisation de MLST.

Finalement l'espoir avec la découverte d'un nouvel antibiotique, grâce à une nouvelle méthode de culture bactérienne, des scientifiques sont parvenus à mettre en évidence un antibiotique très prometteur : la teixobactine ; La teixobactine est une molécule naturelle qui utilisée contre les bactéries, s'avère être un puissant antibiotique. Le composé a été découvert par une équipe de chercheurs américains et allemands dont les résultats sont publiés en janvier 2015 dans la revue Nature sous le titre «A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance», testé sur des souris, il s'est avéré efficace pour traiter un large éventail de sources bactériennes résistantes aux médicaments actuels. Une véritable avancée dans le secteur de la santé. La mise en évidence de la teixobactine a été rendue possible grâce à un protocole révolutionnaire, désormais breveté par la société pharmaceutique américaine NovoBiotic.



Références bibliographiques

1. **AARN. 2015.** Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 14^{ème} Rapport d'évaluation (2012-2013).
2. **AARN. 2016.** Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques: Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 15^{ème} Rapport d'évaluation (De Janvier à Décembre 2014).
3. **Achour, W., Abbassi, M.S., Cherif, A., Jabnoun, S., Khrouf, N., Ben Hassen, A. 2006.** Épidémie d'infection respiratoire à *Pseudomonas aeruginosa* O:12 résistante à l'imipénème dans une unité de réanimation néonatale à Tunis. *Pathol Biol.* **54**(10) : 596-9.
4. **Adams-Haduch, J.M., Paterson, D.L., Sidjabat, H.E., Pasculle, A.W., Potoski, B.A., Muto, C.A., Harrison, L.H., Doi, Y. 2008.** Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(11):3837-3843.
5. **Adeline, B.D., Alix, P.,2, Albert ,S., Jean-Philippe, L. 2012.** Les entérobactéries productrices de carbapénèmases . *alin&as synthese* , N°2.
6. **Agabou, A., Pantel, A. , Ouchenane, Z., Lezzar, N., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A. , Lavigne , J.P. 2014.** First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* .**33**: 1641-46.
7. **Aggoune, N., Tali-Maamar, H., Assaous, F. , Benamrouche, N., Naim, M., Rahal, K. 2014.** Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **2**: 327-329.
8. **Ait el Kadi, M., et al. 2006.** Prévalence des souches d'*Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production de métalo-bétalactamases. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **36**: 386-389.
9. **Aktas, Z., Kayacan, C.B., Schneider, I., et al. 2008.** Carbapenem- hydrolyzing oxacillinase OXA-48, persists in Istanbul, Turkey. *Chemother*. **54**:101-6.
10. **Al Bayssari,C., Diene,S.M., Loucif,L., Gupta,S.K., Dabboussi,F., Mallat,H. et al. 2014.** Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of oprD Gene in

- Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrob Agents Chemother*. **58**: 4966-4970.
- 11. Alfandari, S. 2001.** Infections nosocomiales. Epidémiologie, critères du diagnostic, prévention et principe du traitement. *Maladies infectieuses* . **4** :161-8.
- 12. Amudhan, S. M., Sekar, U., Arunagiri, K., Sekar, B. 2011.** OXA beta-lactamase-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Indian journal of medical microbiology*.**29** (3):269-274.
- 13. Andrade Leonard, N.A., Stegani, L., Ferreira, J. , Rodrigues , C. , Darini , A.L. , Peixe, L. 2015.** International clones (ST11/340/252, ST15, ST101), epidemic plasmids (IncFIIk, IncR, IncL/M) and virulence factors associated with CTX-M(-15, -8, -2) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil . Abstract presented at the 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Copenhagen, Denmark 27 Avril Abstract no P1523 .
- 14. Annie, M. , Vessières, J., Scavizzi, M.R. 1996.** Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Maladies Infectieuses*. **8**: 6-10.
- 15. Arlet, G., Philippon, A. 2003.** Les nouvelles β-lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboratoires*. **352** : 41-55.
- 16. Arsalane, L., Qamouss, Y., Chafik, A ., Boughalem, M., Louzi, L. 2010.** Epidemiology of multi-resistant bacteria in an intensive care unit of a university hospital in Marrakech from October 2006 to September 2009. *les technologies de laboratoire*, **5**: 21.
- 17. Astragneau, P. 2001.** Epidémiologie des infections nosocomiales. *Rev Prat*.**48** : 1525-9.
- 18. Atena, A., Farzaneh, F., Rezvan, M., Zibaei, M . 2016.** Prevalence of CTX-M-Type and PER Extended-Spectrum β-Lactamases Among *Klebsiella* spp. Isolated From Clinical Specimens in the Teaching Hospital of Kashan, Iran. *Iran Red Crescent Med J*. **18**(3): e22260 .
- 19. Aubert, D., Naas, T., Lartigue, M.F., Nordmann, P. 2005.** Novel genetic structure associated with an extended-spectrum beta-lactamase blaVEB gene in a *Providencia stuartii* clinical isolate from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* . **49**:3590–2.
- 20. Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. 1992.** Bactériologie clinique. 2^{ème} Ed. *Ellipses*. P. 103-107.
- 21. Avril, J. M., Dabernat, H., Monteil, D. H. 2000.** Bactériologie clinique. 3^{ème} Ed. *Ellepses*. P. 602.

- 22. Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Arlet G. 2014.** News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathol Biol (Paris)*. **62**:169-78.
- 23. Baba Ahmed Kazi Tani, 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. *East Mediterr Health J* . **18**:382–6.
- 24. Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Décré, D., Genel, N., Boucherit-Otmani, Z., Arlet, G., Drissi, M. 2013.** Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multi-drug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb Drug Resist*. **19**:185–90.
- 25. Babay, H. 2007.** Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients in a Teaching Hospital, Riyadh, Saudi Arabia, 2001-2005. *Jpn J Infect Dis* .**60**:123-125.
- 26. Bahar, G., Mazzariol,A., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini,G.M., Cornaglia,G. 2004.** Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother*. **54**: 282-283.
- 27. Ball, P. 2000.** Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* .**46**:17–24.
- 28. Bakhoum, I. 2004.** Contrôle de qualité et validation de différents microméthodes d'identification bactérienne. Thèse Pharm , n° 8.
- 29. Bakour, S., 2014.** Caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii* .these de Université AMIRA-BEJAIA, p.69.
- 30. Bakour, S., Garcia, V., Brunel, J.M., Gharout sait, A., Touati, A., Rolain, J.M. 2015 c .** Rapid identification of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a Modified Carba NP test. *New Microbes and New Infections* .**10**-1016.
- 31. Bakour, S., Kempf, M., Touati, A., et al. 2012.** Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol*. **61**: 1341-3
- 32. Bakour, S., Olaitan, A.O. , Ammari , H. , Touati, A., Saoudi, S., Saoudi, K., Rolain, J.M. 2015 a.** Emergence of Colistin- and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria:First Case Report. *Microb Drug Resist* . **21**: 279-85.

- 33. Bakour, S., Sahli, F., Touati, A., Rolain, J. M.. 2015 b.** Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes. New Infect.* **3**:34-36.
- 34. Bakour, S., Touati, A., Bachiri, T. , Sahli , F., Tiouit , D., Naim, M., Azouaou, M., Rolain J.M.2014.** First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother* . **20**: 696-701.
- 35. Barguigua, A., Khalid Zerouali,C.D., Khalid Katfy, C., Fatima El Otmani, B.,Timinouni, M., Elmdaghri, N. 2015.** Occurrence of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Moroccan university hospital in Casablanca, Morocco, *Infection, Genetics and Evolution* . **31**:142–148.
- 36. Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, MAD., Wisplinghoff, H., Rodriguez-Valera, F. 2005.** Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* . **43**: 4382–4390.
- 37. Batah, R. 2016.** Identification et profil de résistance de *Serratia marcescens* aux antibiotiques, thèse Universite Badji Mokhtar – Annaba.
- 38. Batah, R., Lotfi, L, Abiola, O.O., Boutefnouchet, N., Allag, H., Rolain, J.-M. 2015 .** Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M 15MediatedHigh Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microbial Drug Resistance*. **21**(4):470-476.
- 39. Bebrone, C., Bogaerts, P., Delbruck, H., Bennink, S., Kupper, M.B., Rezende de,C.R. et al. 2013.** GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**: 396-401.
- 40. Beijerinck, N.1911.** Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl. Koninklijke Akad. Wetensch. **19**:1092-1103.
- 41. Belbel, Z. 2014.** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Université Badji Mokhtar Annaba . P.34, 65 .
- 42. Belbel, Z., Chettibi, H., Dekhil, M., Ladjama, A., Nedjai, S., Rolain, J.M. 2014.** Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microb Drug Resist*. **20**: 310-315.

- 43. Bellido, F., Veuthey, C., Blaser, J. et al. 1990.** Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother*; **25**: 57–68.
- 44. Ben Jaballah , N., Bouziri, A., Kchaou, W., Hamdi, A., Mnif, K., Belhadj, S., Khaldi, A., Kazdagli, K. 2006.** Epidemiology of nosocomial bacterial infections in a neonatal and pediatric Tunisian intensive care unit . *Médecine et Maladies Infectieuses*. **36** (7): 379–385.
- 45. Benouda, A., Touzani, O., Khairallah, M.T., Araj, G. F., Matar, G. M. 2010.** First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **104**(4): 327– 330.
- 46. Ben Redjeb, S., Ben Hassen, A., Hammami, A., Kechrid, A. 2000.** Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie. “Résistance aux antibiotiques”. *Press. Méd.* 1-5.
- 47. Ben salah, D., Makni, S., Ben redjeb, S. 2002.** Epidemiologie des septicemies a bacilles Gram negatif : Données d'un hopital tunisien (1996-1998) = Epidemiology of Gram-negative bacilli septicemia: data of a Tunisian Hospital (1996-1998). *Tunisie médicale*. **80**(5) : 245-248.
- 48. Ben Slama, K., Gharbi, S., Jouini, A., Maarouf, M., Fendri, C., Boudabous, A., and Gtari, M. 2011.** Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in Intensive Care Unit and Otolaryngology Department of a Tunisian Hospital. *African Journal of Microbiology Research* . **5** (19): 3005-3011.
- 49. Bergogne-Bérénin, E., Towner, K.J. 1996.** *Acinetobacter spp.* as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin. Microbiol.Rev* . **9** (2) : 148-165.
- 50. Bernard, W., Villard, J.F. 2006.** Spécificités de l'évaluation de la douleur chez les personnes âgées, *Psychol NeuroPsychiatr* . **4** (3) : 171-8.
- 51. Berrouane, Y.F., McNutt, L.A., Buschelman, B.J., Rhomberg, P.R., Sanford, M.D., Hollis, R.J. et al. 2000.** Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by a contaminated drain in a whirlpool bathtub. *Clin Infect Dis*. **31**(6):1331-7.
- 52. Berrazeg, M., Drissi, M., Medjahed, L., Rolain, J.M. 2013.** Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Med Microbiol* .**62**:864–74.
- 53. Bert, F., Lambert-Zechovsky, N. 2007.** Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care units and other wards. *J Antimicrob Chemother*. **37**: 809-13.
- 54. Bert, F., Lambert-Zechovsky, N. 2000.** *Pseudomonas aeruginosa* :actualités sur la résistance aux β-lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques*. **2** :195-201.

- 55. Bertrand , X., Blasco, G., Belle , E. , Boillot, A., Capellier, G. , Talon, D. 2003.** *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. **22** :505–509.
- 56. Bertrand , X., Costa, Y., Pina, P. 2005.** Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les bactériémies : données de l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) (1998-2003). *Médecine et Maladies Infectieuses*. **35**(6) :329-334.
- 57. Bertrand, X., et al. 2008.** *Pseudomonas aeruginosa*: données des réseaux de l'ONERBA et résultats de l'enquête trans-réseaux 2007. *Médecine et maladies infectieuses*. **38**: 63-64.
- 58. Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadega ,L. 1983.** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **5**(2): 279–313.
- 59.Boerlin, P., White, D.G. 2006.** Antimicrobial resistance and its epidemiology. In : Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. (Eds), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medecine*, Fourth Edition. Blackwell publishing : Ames. 27-43.
- 60.Bogaerts, P., Galimand, M., Bauraing, C., Deplano, A., Vanhoof, R., De, M.R., et al. 2007.** Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. **59**:459–64.
- 61.Bogaerts, P., Rezende de castro, R., Roisin, S., Deplano, A. , Huang, T.D. , Hallin, M., Denis, O., Glupczynski, Y. .2012.** Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* . **67**: 1552-53.
- 62.Bonnet, R. 2004.** Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**: 1–14.
- 63. Bonnet, R., Marchandin, H., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Jumas-Bilak, E., Sirot, J. 2002.** Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. **46** : 2004-2006.
- 64. Boo, T.W., Walsh, F., Crowley, B. 2004.** Molecular characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter genomic species 3*. *J Med Microbiol*. **58** (2):209-216.
- 65. Bossert, I. D., Young L.Y. 1986.** Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental Microbiology*. **52** (5) : 1117-1122.

- 66.****Bouguenoun, W., Bakour, S., Bentorki, A.A., Al Bayssari, C., Merad, T., Rolain, J.M. 2016.** Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **7** :135-140
- 67.****Boulanger, A., Naas, T., Fortineau, N., Figueiredo, S. and Nordmann, P. 2012.** NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*. **56**: 2214-15.
- 68.****Bouteleux, C. 2005.** Survie des Entérobactéries dans les eaux de distribution : Rôle de la matière organique d'origine algale. Thèse de Doctorat. Université Henri-Poincaré-Nancy I. p 275
- 69 .****Boutiba-Ben Boubaker, I. , Boukadida, J., Triki, O., Hannachi, N., Ben Redjeb, S. 2003.**A Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to a multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* . *Pathologie Biologie*. **51**:147–150.
- 70.****Bouvet, PJM. , Joly-Guillou, ML., Freny, J. , Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C. 2000.** Précis de Bactériologie Clinique. 1239-58.
- 71.****Bouzidi, N., Aoun, L., Dekhil, M., Granier, S.A., Poirel, L., Brisabois, A., et al. 2011.** Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene armA in non-Typhi` Salmo-nella isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J Antimicrob Chemother* . **66**:2180–1.
- 72.** **Boyer , C. 2013.** Lutte contre les bactéries multi-résistantes en ville : état des lieux et moyens mis en œuvre après une hospitalisation. Université Paris diderot - paris7.Faculté de Médecine.
- 73.** **Boyce, T. G., Gruber, W. C., Fisher, R. G. 2004.** *Enterobacter*. In R. D. Feigin, Cherry, Demmler & Kaplan (Eds.), *Textbook of pediatric infectious diseases* 5th ed. 1427- 1431.
- 74.** **Bradford, P.A. 2001.** Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. **14**: 933-51.
- 75.** **Brito, D.V.D., Oliveira, E.J., Matos, C., Abdallah, V.O.S , Gontijo Filho, P.P. 2003 .**An outbreak of conjunctivitis caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian newborn intensive care unit. *Brazil. J Infect Dis* . **7** : 234-5.

- 76. Brisse, S., Verhoef, J. 2001.** Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51** :915-924.
- 77. Brown, S., Amyes, S. G. B. 2005.** The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect.* **11**: 326-329
- 78. Burnichon, G., Le Floch, M.F., Virmaux, M., Baron, R., Tandé, D. 2004.** Le jeune Outbreak of *Enterobacter aerogenes* in paediatric unit. *Médecine et Maladies Infectieuses* **34** (4) :166–170.
- 79. Camp, C., Owatha, I.T., 2010.** A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. *Labmedicine.* **41**(11).
- 80. Cantón, R., Coque, T.M. 2006.** The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* **9** : 466-75.
- 81. Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M. 2008.** Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **14**:144-153.
- 82. Carabalona, J.F., Omar, E., Di Roio, C.2014.** Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique en neuro-réanimation : épidémiologie. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* . **33** (2) : 91.
- 83. Caron, F. 2003.** Physiopathologie des infections urinaires nosocomiales. *Médecine et Maladies Infectieuses.* **33** (9) : 438–446.
- 84 .Carrér, A., Poirel, L., Yilmaz, M., et al. 2010.** Spread of OXA-48-encoding plasmid from Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**:1369-73.
- 85. CA-SFM .2012.** comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.Lettre d'information concernant la détection de la production de carbapénèmases chez les entérobactéries. Janvier 2012.
- 86. CA-SFM.2015.** comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie . Repéré à : www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMEUCASTV1_2015.pdf
- 87.Castanheira, M., Deshpande, L.M., Costello, A., Davies , T.A., and Jones, R.N. 2014.** Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother.* **69** : 1804-14.

- 88. Castanheira, M., Deshpande, L.M., Mathai, D. et al. 2011.** Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* . **55**: 1274-8.
- 89. Castanheira, M., Mendes, R.E., Walsh, T.R., Gales, A.C., and Jones, R.N. 2004.** Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the sentry antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**: 2344-2345.
- 90. Castanheira, M., Wanger, A., Kruzel, M., Deshpande, L.M., Jones, R.N. 2008.** Emergence and clonal dissemination of OXA-24- and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains in Houston, Texas: report from the sentry Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol*. **46**: 3179-80.
- 91. Cattoen, C., Levent, T., Grandbastien, B., Descamps, D., Bouillet, L., Coignard, B., Beaucaire, G., Réseau de microbiologistes de l'ARECLIN. 1999.** Observatoire régional *Pseudomonas aeruginosa* du Nord-Pas-de-Calais: Données épidémiologiques et microbiologiques. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **29**(3):160–166.
- 92. Cattoir, V. 2004.** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Path Biol*. **52**: 607-616.
- 93. Cattoir, V. 2008.** Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Mapar; *Pathologie infectieuse en réanimation*. Paris.
- 94. Cavallo, J.D., Fabre, R., Leblanc, F., Nicolas-Chanoine, M.H., Thabaut, A., and the GERPB .2000a.** Antibiotic susceptibility and mechanisms of β -lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa* : a french multicentre study (1996). *J. Antimicrob. Chemother*. **46** :133- 136.
- 95. Cavallo, J.D., Péan, Y., Weber, P. 2003.** Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance des bactéries aux antibiotiques (ONERBA). Factors influencing the frequency and the level of susceptibility of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* strains to antibiotics, isolated from patients with urinary infections in ambulatory treatment. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **30** (11): 714–720.
- 96. Chaibdraa A., Medjellekh M.S., Saouli A., Bentakouk M.C. 2008.** Le *Pseudomonas*: expérience du centre des brûlés d'annaba et revue de la littérature. *Annals of Burns and Fire Disasters* . **21** (4) : 210–218

- 97. Channouf, A.2016.** La méningite post-opératoire à *Acinetobacter baumanii* multirésistant (Étude rétrospective à propos de 10 cas). These Universite Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculte de Medecine et de Pharmacie Fes, maroc , n° 75/16 p.19.
- 98. Chbani, F., Zoughaghi, L., Taouragt, K., Aarab, H., Benaouda, A. 2004.** *Acinetobacter baumannii*: épidemiologie et résistance aux antibiotiques. *Prat.* **14**: 23-4.
- 99. Chinbo, M., Moutachakkir, M., Addebbous, A., El Khoudri, N., Chabaa, L., and Sora, N. 2014.** Epidemiology and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Moroccan pediatric hospital: therapeutic guidelines, *International Journal of Innovation and Scientific Research* . **11** (2) : 283-290.
- 100. Cho, Y.J., Moon, D.C., Jin, J.S., Choi, C.H., Lee, Y.C., Lee, J.C. 2009.** Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **64**(2):185-190.
- 101. Chouchani, C., Marrakchi, R., El SA.2011.** Evolution of beta-lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. *Crit Rev Microbiol.* **37**:167–77.
- 102. Cicek, A.C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A.O., Peleg, A.Y., Sandalli, C. 2014.** OXA- and GEStype β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect.* **20**: 410-415.
- 103. Cisneros, J.M., Rodriguez-Bano, J., Fernandez-Cuenca, F., et al. 2005.** Risk factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clinical microbiology and infection.* **11**(11): 874-879.
- 104. Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C.G. 2004.** Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* **42**: 5644-9
- 105. Cuzon, G., Bentchouala, C., Vogel, A., Hery, M., Lezzar, A., Smati, F., Dortet, L., and Naas, T. 2015.** First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **46** (6):725-7

- 106. Cobben, N.A., Drent, M., Jonkers, M., Wouters, E.F., Vaneechoutte, M., Stobberingh, E.E. 1996.** Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. *J Hosp Infect.* **33** (1):63-70.
- 107. Coelho, J. M., Turton, J. F. , Kaufmann, M. E., Glover, J., Woodford, N., Warner, M., Palepou, M.F., Pike, R. T., Pitt, L., Patel, B. C. and Livermore, D. M. 2006.** Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* **44**: 3623-3627.
- 108. Collignon, A., Beljean-Leymarie, M., Farinotti, R., Doutremepuich, C. 2007.** Infectiologie. Volume 3 de Collection Le Moniteur internat. *Le Moniteur des Pharmacies* **3** : 354-355
- 109. Cornaglia, G., Giamarellou,H., and Rossolini,G.M. 2011.** Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.* **11**: 381-393.
- 110. Corvec, S., Poirel, L., Espaze, E., et al. 2008.** Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J Hosp Infect.* **68**: 73-82.
- 111. Da Fonseca, E.L., Vieira,V.V., Cipriano,R., and Vicente,A.C. 2007.** Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* **59**: 576-577.
- 112. Dalla-Costa, L. M., Coelho, J. M. , Souza, H. A. , Castro, M. E., Stier, C. J., Bragagnolo, K. L. , Rea-Neto, A., Penteado-Filho, S. R., Livermore, D. M., and Woodford, N. 2003.** Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* **41**: 3403-3406
- 113. Danel, F., Hall,L.M., Gur,D., and Livermore,D.M.1995b.** OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**: 1881-1884.
- 114. Datta, N., and Kontomichalou, P. 1965.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* . **208**: 239-241.

- 115. Decré, D., 2012.** *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. *Revue Francophone des laboratoires* ; N. 441.
- 116. Decré, D., Verdet, C., Raskine, L., Blanchard, H., Burghoffer, B., Philippon, A., et al. 2002.** Characterization of CMY-type beta-lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in four hospitals in the Paris area. *J Antimicrob Chemother.* **50**:681–8.
- 117. Delarras, C. 2003.** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. TEC & DOC.Lavoisier. p. 269
- 118. Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. 2007.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. *Ed. Masson.* 2ème édition. 344-345.
- 119. Descy, J., Meex , C., Melin, P., Hayette , M.P. , Huynen , P., De Mol , P.. 2010.** Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute, *Rev Med Lièg.* **65**: 29-34
- 120. Diancourt, L., Passet, V. , Verhoef, J. , Grimont, P. A., and Brisse, S. 2005.** Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J.Clin.Microbiol.* **43**: 4178-4182.
- 121. Diene 1, S. M., Fenollar, F., Fall , B., Sow, K., Niang, B., Samba Ba , P., Wade , B., Raoult, D., and Rolain, J.M.2014.** CTX-M-15-producing *Morganella morganii* from Hopital Principal de Dakar, Senegal . *New Microbes and New Infections.* **2** (2):46-49
- 122. Diene, S. M., Bruder, N., Raoult, D., and Rolain, J.-M. 2011.** Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-β-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **37** (6): 544–546.
- 123. Djahmi, N., C. Dunyach-Remy, A. Pantel, M. Dekhil, A. Sotto, and J. P. Lavigne. 2014.** Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed. Res. Int.* 305784.
- 124.Djelouat, S. 2009.** Les entérobactéries: L'essentiel. [En ligne]. <http://knol.google.com/k/salim-djelouat/mes-knols/>. (Consulté le 16 Mai 2011).

- 125. Doi, Y., Adams, J.M., Yamane, K., and Paterson, D.L. 2007.** Identification of 16S rRNA methylas-producing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains in North America. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. **51** (11): 4209-4210.
- 126. Doi, Y., and Arakawa, Y. 2007.** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. **45**: 88-94.
- 127. Doi, Y., de Oliveira, G.D., Adams, J., and Paterson, D.L. 2007a.** Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. **51**: 852-856.
- 128. Dortet, L., Brechard, L., Poirel, L., Nordmann, P. 2013.** Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. **20**(4):340-4.
- 129. Dortet, L., Cuzon, G., Nordmann, P. 2014.** Note technique : Détection des souches des entérobactéries productrices d'une carbapénémase . CNR associé de la résistance aux antibiotiques, « Entérobactéries productrices de carbapénémases ». Hôpital de Bicêtre, Service de Bactériologie-Hygiène, 78 avenue du Général Leclerc, 94270 Le Kremlin-Bicêtre.
- 130. Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C.J., Cattoir, V, 2006.** Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J Clin Microbiol*. **44**: 4471-8.
- 131. Dortet, L., Poirel, L., Errera, C., and Nordmann, P. 2014.** Carba Acineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* . **52**(7): 2359-2364.
- 132. Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P. 2012.** Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*. **56**: 6437-6440.
- 133. Dortet , L., Poirel , L., Nordman, P. 2013.** Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénémases. *feuilles de Biologie*. N° 312 .
- 134. Drame, B., 2001.** Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques. Thèse Pharm., Dakar, n° 86.
- 135. Drissi, M. 2007.** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du C.H.U. de Tlemcen. Mécanismes de résistance aux β-lactamines , Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. p :57, 82.
- 136. Drissi, M., Poirel, L., Mugnier, P.D., Baba, A.Z., Nordmann, P. 2010.** Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **29**: 1457-8.

- 137. Dubois,V., Poirel, L., Marie,C., Arpin,C., Nordmann,P., and Quentin,C. 2002b.** Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 638-645.
- 138. Edwards, P.R., Ewing, W.H. 1977.** Identification of the *Enterobacteriaceae*. Ed Burgess, Minneapolis.
- 139. El-Ageery, S.M., and Al-Hazmi, S.S. 2014.** Microbiological and molecular detection of VIM-1 metallo beta lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **18**(7) : 965-970.
- 140. El Garch, F., Bogaerts,P., Bebrone,C., Galleni,M., and Glupczynski,Y. 2011.** OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**: 4828-4833.
- 141. Elhani, D. 2012.** Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accentue. *Ann Biol Clin.* **70**(2). 117-40.
- 142. El mahi , F. 2013.** Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénèmases diagnostiquées au laboratoire de microbiologie du chu de rabat, Universite Mohammed v- Souissi Faculte de Medecine et de Pharmacie –Rabat, these n°: 95, p57 .
- 143. Elmeskini, K., 2011.** Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, thèse de Universite Mohammed V. Faculte de Medecine et de Pharmacie-Rabat-These n:78, p1.
- 144. Elouannass, M., Bajou, T., Lemouer, A.H., Foissaud, V., Hervé, V., Baaj, A.J. 2003.** *A.baumannii* : étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, maroc. *Méd Mal Infet.* **33** : 361-364.
- 145. Ennigrou, S., Mokhtar, L. , Benalaya, N., Dziri, C., Cherif, A., Najah N., Ben redjeb, S., Zouari, B.2000.** Etude de l'incidence et approche du surcoût des infections nosocomiales en chirurgie générale = Study of incidence of nosocomial infection in a general surgery service. **78**(11) : 628-633.
- 146. Essayagh,T., Aichatou K., Elhamzaoui., S., 2012 .** Carbapénémases chez *Klebsiella pneumoniae* : antibiogramme, E-test et test de Hodge. *Ann Biol Clin.* **70** (3) : 299-304.

- 147. European Centre for Disease Prevention and Control** .Data base [Internet]. Disponible sur : <http://www.ecdc.europa.eu>
- 148. Euzéby, JP. 2003.** *Acinetobacter* Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire crée le 31 décembre, <http://www.bactero.cict.fr/bacdico/aa/acetobacter.html>.
- 149. Euzéby, J.P., 2005.** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- 150. Ewing, W.H., Edwards, P.R.1960.** The principal divisions and groups of *Enterobacteriaceae* and their differentiation. *Intern Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* **10** :1-12.
- 151. Fankhauser, C., Cherkaoui, A., Renzi, G., et al. 2011.** Carbapenem-resistant *enterobacteriaceae*:A challenge for early detection and infection control. *BMC Proceedings.* **5** (6):142.
- 152. Fauchère, J. L., Avril, J. L.** 2002. Bactériologie générale et médicale. *Ed Ellipses*. Paris. P.368.
- 153. Farmer, J.J., 1999.** *Enterobacteriaceae* : Introduction and identification In : Manual of clinical Microbiology, P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfatter, Tenoven F.C. and R.H. Yolken (eds) *7th ed. American Society for Microbiology*, Washington DC : 442-458.
- 154. Fechkeur, Y., Thibault, M. 1998.** *Acinetobacter* : aspect bactériologique, habitat, pouvoir pathogène et sensibilité aux antibiotiques. *Feuilles de Biologie.* **41**(222) : 39-45.
- 155. Fleming A.** Penicillin. Nobel lecture, December 11, 1945. [pdf en ligne] (1945) Adresse URL : http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleminglecture.html consulté le 30/05/2012.
- 156. Fortineau, N., Poirel, L., and Nordmann, P. 2001.** plasmidique et inductible céphalosporinase DHA-2 de *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* **47**: 207-210.
- 157. François, H., Costa , P., Colau , J., Gérard , A., Liard , F., Bohbot , J.-M., Leng , J.J., Lobel , B., Soussy , C.-J., Boulanger, P. 2006 .** Les infections urinaires de la femme en médecine générale: Résultats d'un observatoire réalisé auprès de 7916 patientes. *La Presse Médicale* . **35**(9) : 1235-1240.
- 158. Gaillet, O., Clément, C., Simonet, M., and Philippon, A. 1997.** Novel transférables β -lactame avec des caractéristiques de résistance céphalosporinase à *Salmonella enteritidis*. *J. Antimicrob Chemother.* **39** : 85-87.

- 159. Garland, S.M., Mackay, S., Tabrizi, S., Jacobs, S. 1996.** *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with a contaminated blood-gas analyser in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **33**(2):145-51.
- 160. Georgopapadakou, N.H. 1993.** Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2045-2053.
- 161. Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasme, L., Madoux, J. et al. 2012.** CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr J Microbiol Res.* **6**:5306-13.
- 162. Giakkoupi, P., Papagiannitsis, C.C., Miriagou, V., et al. 2001.** An update of the evolving epidemic of *bla_{KPC-2}*-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J.Antimicrob Chemother.* **66**:1510-3.
- 163. Giamarellou, H., Antoniadou, A., Kanellakopoulou, K., 2008.** *Acinetobacter baumannii* : a universel threat to public health? *International journal antimicrobial agent* **32**: 106-119.
- 164. Gilarranz, R., Juan,C., Castillo-Vera,J., Chamizo,F.J., Artiles,F., Alamo,I., and Oliver,A. 2013.** First detection in Europe of the metallo-beta-lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **19**: 424-427.
- 165. Girlich, D., Naas, T. and Nordmann. P. 2004.** Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 2043-2048
- 166. Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P. 2012.** Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **50**(2): 477-479 .
- 167. Giske, C.G., Rylander, M., and Kronvall, G. 2003.** VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3034-35.
- 168. Glupczynski,Y., Bogaerts,P., Deplano,A., Berhin,C., Huang,T.D., Van,E.J., and Rodriguez-Villalobos,H.2010.** Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* **65**: 866-871.

- 169. Gniadkowski, M. 2001.** Evolution and epidemiology of extended-spectrum Béta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect.* **7** : 597-608
- 170. Godfrey, A. J., Bryan, L. E., and Rabin, H. R. 1981.** b-Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19** :705-711.
- 171. Godineau-Gautheyi, N., Lesage, D., Tessier, F., Kollia, D., Daguet, GL. 1988.** *Acinetobacter calcoaceticus* variété *Antitratus* ou *Acinetobacter baumannii*. Etude de la sensibilité aux antibiotiques de 65 souches hospitalières. *Méd Maladi Infec.* **2** : 124-129.
- 172. Goldfarb, D., Harvey, S.B., Jessamine, K., Jessamine, P., Toye, B., Desjardins, M. 2009.** Detection of Plasmid-Mediated KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: Evidence of Intrahospital Transmission. *J Clin Microbiol.* **47**(6): 1920-1922.
- 173. Gordon, N.C. , Wareham, D.W., 2010.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents.* **35**: 219-226.
- 174. Gotoh, N., Nunomura, K., and Nishino, T. 1990.** Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefsulodin: modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**:513-523.
- 175. Grail, N., Andremont, A., Armand-Lefèvre, L., 2011.** Résistance aux carbapénèmes vers une nouvelle impasse? *Journal des antinfectieux* . P.16
- 176. Guessennd , N., Bremont, S., Gbonon, V., Kacou-NDouba, A., Ekaza, E., Lambert, T., Dosso, M., Courvalin, P. 2008.** Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie.* **56**(7-8) : 439-446.
- 177. Guerin, J. M. 1996.** Septicémie à *Enterobacter* = *Enterobacter septicemia*. *La Semaine des hôpitaux de Paris* . **72** : 292-299.
- 178. Gueye,O. 2007.** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a gram négatif. Université cheikh anta diop de Dakar ,Faculte de Medecine et de Pharmacie. N36 .
- 179. Guillou, J., et al. 2002.** *Acinetobacter* et infections nosocomiales. *Presse Med* . **31** : 651-6.

- 180.** GÜLMEZ, D., WOODFORD, N., PALEPOU, M.F., et al. 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents*. **31**: 523-6.
- 181.** GUPTA, S. K., PADMANABHAN, B. R. , DIENE, S. M. , LOPEZ-ROJAS, R., KEMPF, M., LANDRAUD, L., and ROLAIN, J. M. 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**: 212-220.
- 182.** GUPTA, V., DATTA, P., CHANDER, J., 2006. Prevalence of metallo-β lactamase (MBL) producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in a tertiary care hospital in India. *Journal of Infection*. **52**(5): 311–314.
- 183.** HAEGGMAN, S., LÖFDALH, S., PAAUW, A., VERHOEF, J., and BRISSE, S. 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2400-2408.
- 184.** HALL, L.M., LIVERMORE, D.M., GUR, D., AKOVA, M., and AKALIN, H.E. 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**: 1637-1644.
- 185.** HANCOCK, R.E., and BRINKMAN, F.S. 2002. Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* **56** : 17-38.
- 186.** HANSON, N.D. 2003. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother.* **52**: 2-4.
- 187.** HARBOTTLE, H., THAKUR, S., ZHAO, S., WHITE, D.G. 2006. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim. Biotechnol.* **17**:111-124.
- 188.** HART, C. A. 2006 . *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Serratia* spp.. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and practice of Clinical Bacteriology* .2nd ed: 377-386
- 189.** HERITIER, C., POIREL, L., FOURNIER, P.E., et al. 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**: 4174-9
- 190.** HIGGINS PG, POIREL L, LEHMANN M, NORDMANN P, SEIFERT H. 2009. OXA-143, a novel carbapenemhydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 5035-8.
- 191.** HOCQUET, D., PLESIAT, P., DEHECQ, B., MARIOTTE, P., TALON, D., and BERTRAND, X. 2010. Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and

- extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 3512-3515.
- 192. Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R.D., 2012.** *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* **3**(3):243-50
- 193. Hsueh, P.R. 2012.** Study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) in the Asia-Pacific region, 2002–2010. *Int J Antimicrob Agents.* **40** : 1–3.
- 194. Huang L.Y., Lu P.L., Chen T.L., Chang F.Y., Fung C.P., Siu L.K. 2010.** Molecular characterization of β -lactamase genes and their genetic structures in *Acinetobacter* genospecies 3 isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(6):2699-2703.
- 195. Hujer, K. M., Hujer, A. M. , Hulten, E.A , Bajaksouzian, S., Adams, J. M. , Donskey, C. J., Ecker, D. J. , Massire, C., Eshoo, M., Sampath, R., Thomson, J. M., Rather, , P. N., Craft, D. W. , Fishbain, J. T., Ewell, A. J. , Jacobs, M. R., Paterson, D. L., and Bonomo. R.A. 2006.** Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 4114–4123.
- 196. Iabadene, H. , Bakour, R., Messai, Y., Da, C.A., Arlet, G. 2009.** Detection of bla CTX-M- 14 and aac(3)-II genes in *Salmonella enterica* serotype Kedougou in Algeria. *Med Mal Infect.* **39**:806–7.
- 197. Iabadene, H. 2 , Dallenne, C., Messai, Y., Geneste, D., Bakour, R., Arlet, G. 2009.** Emergence of extended spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:4043–4.
- 198. Iabadene, H. , Messai, Y., Ammari, H., Alouache, S., Verdet, C., Bakour, R., et al. 2009.** Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* **34**:340–2.
- 199. Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N., Lounes, S., Bakour, R., et al. 2008.** Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* **62**:133–6.
- 200. Iraz,M., Duzgun,A.O., Cicek,A.C., Bonnin,R.A., Ceylan,A., Saral,A. et al. 2014.** Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **78**: 292-294.

- 201. Iroha, I.R., Esimone,C.,O., Neumann Lennart Marlinghaus,S., Korte, M., Szabados,F., Gatermann,S., and Martin Kaase, M. 2012.** First description of *Escherichia coli* producing CTX-M-15- extended spectrum beta lactamase (ESBL) in out-patients from south eastern Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* .11:19
- 202. Jain, R., Danziger, L.H. 2004.** Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann Pharmacother*. 38(9):1449-1459.
- 203. Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., et al. 1998.** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.*36 (7) :1938–1941.
- 204. Jean, M., 2004.** Evaluation et gestion des risques liés à *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de thermalisme. *Atelier Santé Environnement*. ENSP. P: 5-6.
- 205. Johnston, A.M. 1998.** Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *BMJ*. 317 :665-667.
- 206. Joffin , J.N. , Leyral, G. 2006.** Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. 4^{ème} édition, p.207-209.
- 207. Jolivet-gougeon, A. 2011.** Émergence d'entérobactéries productrices de carbapénèmases, Agents biologiques. Anses , Bulletin de veille scientifique no 16 . Santé / Environnement / Travail .
- 208. Joly, B., Reynaud, A. 2003.** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. TEC & DOC. *Lavoisier*. Paris. P. 356.
- 209. Jovcic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic,V., Rackov,G., Begovic, J., Topisirovic,L., and Kojic, M. 2011.** Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother*. 55: 3929-3931.
- 210. Juan, C., Beceiro, A., Gutierrez,O., Alberti,S., Garau,M., Perez,J.L. et al. 2008.** Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 52: 3589-3596.
- 211. Kalai, B.S., Achour,W., Abbassi,M.S., Bejaoui,M., Abdeladhim,A., and Ben,H.A. 2007** Nosocomial outbreak of OXA-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Tunisia. *Clin Microbiol Infect* .13: 794-800.
- 212. Karlowsky, J.A., Draghi, D.C., Jones, M.E., Thornsberry, C., Friedland,I.R., Sahm, D.F. 2003.** Surveillance for Antimicrobial Susceptibility among Clinical Isolates of

- Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. **47**:1681-1688.
- 213. Karthikeyan, K., Thirunarayan, M. A. and Krishnan, P. 2010.** Coexistence of *bla* OXA-23 with *bla*NDM-1 and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* **65**: 2253-2254.
- 214. Kempf, M., Bakour, S., Flaudrops, C. , Berrazeg, M. , Brunel, J.M. , Drissi, M. , Mesli, E. , Touati, A., and Rolain, J.M. 2012.** Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* **7**: 31676.
- 215. Kermas, R., Touati, A., Brasme, L., Le Magrex-Debar, E., Mehrane, S., Weill, F.X., et al. 2012.** Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serotype Brunei and Heidelberg at the Hussein Dey hospital in Algiers (Algeria). *Foodborne Pathog Dis*. **9**:803–8.
- 216. Khalilzadeh, P. 2009.** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat. P: 40.
- 217. Khayar, Y. 2011.** comportement des enterobacteries isolees des urines vis-a-vis de l'amoxicilline – acide clavulanique l'imipeneme et l'ertapeneme, Universite Mohammed v Faculte de Medecine et de Pharmacie -Rabat .these n°:99.
- 218. Khennouchi, N.C., 2016.** Evaluation de l'antibioresistance du genre *Enterobacter* aux antibiotique , thèse Université Badji Mokhtar, Annaba, Département de biochimie
- 219. Khennouchi, N.C., Loucif, L., Boutefnouchet, N., Allag, H., Rolain, J.M. 2015.** MALDI-TOF MS as a Tool To Detect a Nosocomial Outbreak of Extended-Spectrum-beta-Lactamase- and ArmA Methyltransferase-Producing *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates in Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*. **59**: 6477-6483.
- 220. Khorsi, K., Messai , Y., Hamidi, M. , Ammari, H. and Bakour, R. 2015.** High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes *bla*OXA-23-like, *bla*OXA-24-like and *bla*NDM-1 in Algiers hospitals. *Asian Pac J Trop Med*. **8** : 438-46.
- 221. Kim, J. W., Heo, S. T, Jin, J. S., Choi, C.H., Lee, Y.C., Jeong, Y.G., Kim, S. J. and Lee, J. C. 2008.** Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*OXA-23, *bla*PER-1 and *armA* in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect*. **14** : 716-718.

- 222. Kim, Y.A., Z.A. Qureshi, J.M. Adams-Haduch JM, Y.S. Park, K.A. Shutt, and Y. Doi .2012.** Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: emergence of sequence type 131. *Clin Infect Dis.* **55** : 224-31.
- 223. Kim, U.J., Kim, H.K., An, J.H., Cho, S.K., Park, K.H., Jang, H.C. 2014.** Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Med J.* **50**: 37-44.
- 224. Koeck, J.L., Arlet, G., Philippon, A., Basmaciogullari, S., Thien, H.V., Buisson, Y., et al. 1997.** A plasmid-mediated CMY-2 beta-lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. *FEMS Microbiol Lett.* **152** :255–60.
- 225. Koh, T. H., Sng, L. H., Wang, G. C., Hsu, L. Y. , and Zhao, Y. 2007.** IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother.* **59**: 627-632.
- 226. Kooli , I., Kadri, Y., Ben Abdallah, H., Mhalla, S., Haddad, O., Noomen, S., Mastouri, M. 2014.** Epidemiology of multiresistant bacteria in a neonatal Tunisian unit, *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* . **27** (5):236–242.
- 227. Kotsakis, S.D., Papagiannitsis, C.C., Tzelepi,E., Legakis,N.J., Miriagou,V., and Tzouvelekis, L.S.2010.** GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 1331-1333.
- 228. Kruger, T., Szabo, D., Keddy, K.H., Deeley, K., Marsh, J.W., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Paterson, D.L.2004.** Infections with non typhoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **48** (11): 4263-4270.
- 229. Kusradze, I.a., Diene, S.M., Goderdzishvili, M., and Rolain, J.M. 2011.** Molecular Detection of OXA Carbapenemase Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates from Iraq and Georgia. *International journal of antimicrobial agents.* **38**(2): 164–168.
- 230. Kumar, A., Schweizer, H.P. 2005.** Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Delivery Rev.* **57**: 1486-1513.
- 231. Labid, A., Gacemi-Kirane, D., Timinouni, M., Amoura, K., and Rolain, J.M. 2014.** High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the *Enterobacteriaceae* in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *African Journal of Microbiology Research* . **8** (9) :947-954 .

- 232. Labuschagne,C.J., Weldorf,G.F., Ehlers,M.M., and Dove,M.G.2008.** Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents* . **31**: 527-530.
- 233. Lahlou,A .I. , Chegri, M., L'Kassmi, H. 2010.** Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires à l'hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès Epidemiology and antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated in urinary tract infections at the Moulay Ismail Military Hospital of Meknes. *Médecine et Maladies Infectieuses* . **40** (11) :632–636.
- 234. Lahsoune, M., Boutayeb, H., Zerouali, K., Belabbes, H., El Mdaghri, N. 2007.** Prevalence and in vitro antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter baumannii* strains in a Moroccan university hospital, *Médecine et Maladies Infectieuses* . **37**(12) : 828–831.
- 235. Lambert, T.2007.** *Acinetobacter*. In : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. Bactériologie médicale:Techniques usuelles. *Ed Elsevier Masson* .Paris. P :344-346.
- 236. Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., et al. 1999.** Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. **43**: 1584-90.
- 237. Lavigne, J.P., Sotto, A., Merle, C., Jourdan, J., Soussy ,C-J., Sirot, D. 2002.** Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux β-lactamines et prévalence en clinique. *Pathol Biol*. **50**: 388-93.
- 238. Lepape, A. 2003.** Epidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de réanimation*. **22**: 520-522.
- 239. Leotard , S., Negrin, N. 2010.** Épidémiologie des entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre étendu (E-BLSE) au centre hospitalier de Grasse(2005–2008).**58**(1) : 35–38.
- 240. Leclerc, H., Mossel, D.A., Edberg, S.C., Struijk, C.B. 2001.** Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol*. **55** : 201-234.
- 241. Lee, H., Yong, D., Yum, J. H. , Roh, K. H. , Lee, K., Yamane, K., Arakawa, Y., and Chong, Y. 2006a.** Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacinresistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **56** : 305–312.

- 242.** Lee, K., Kim,C.K., Yong,D., Jeong,S.H., Yum,J.H., Seo,Y.H., Docquier,J.D. and Chong,Y. **2010**.Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J. Microbiol. Methods.* **83**:149-152.
- 243.** Lee, K., Lim, Y.S., Yong, D., Yum, J.H., Chong, Y. **2003**. Evaluation of the Hodge Test and the Impenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* **41** (10): 4623-4629.
- 244.** Lehner, A., Roger, S., Fanning, S., and Iversen,C. **2011** *.Enterobacter* In : molecular detection of humain bacterial pathogens. USA, CRC. 853-863.
- 245.** Levy, C., Bingen, E., Aujard, Y., Boucherat, M., Floret, D., Gendrel, D., Cohen, R. **2008**. Surveillance network of bacterial meningitis in children, 7 years of survey in France *Archives de Pédiatrie.* **15**(10): S99–S104.
- 246.** Liazid, A. **2011** .Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen these de l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, p.51
- 247.** Libisch, B., Muzslay, M., Gacs, M., Minarovits, J. , Knausz, M. , Watine , J., Ternak , G., Kenez , E., Kustos , I. , Rokusz, L. , Szeles, K. , Balogh, B. and Fuzi, M. **2006**. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 4220-4223.
- 248.** Lie, S., Abdou, F. K., **2002**. Sensibilité et révolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du Point G. Thèse de doctorat. P 15.
- 249.** Li, M., Pan, P., Hu, C. **2013**. Pathogen distribution and antibiotic resistance for hospital aquired pneumonia in respiratory medicine intensive care unit. *J. Cent. South.* **38**: 1672-7347.
- 250.** Liou, B.H., Duh, R.W., Lin, Y.T., Lauderdale, T.L., Fung, C.P. **2014**. A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* **47**: 387-393.
- 251.** Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D.**2009**.Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* **22**: 582-610.
- 252.** Livermore, D.M.**1992**. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **36** :2046-2048

- 253. Livermore, D.M. 2008.** Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* **14**:3-10.
- 254. Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A. , Iversen, A. , Grundmann , H. , Do, T., Lanotte, P., Mastouri , M., Elghmati, M.S., Rojo, F., Mejdi, S., and Giske, C.G. 2011.** Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* **6**: e25617.
- 255. Magnet, S., Blanchard, J.S. 2005.** Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* **105**:477–98.
- 256. Maki, D. G., Rhame, F. S., Mackel, D. C., & Bennett, J. V. 1976.** Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products: I. Epidemiologic and clinical features. *The American Journal of Medicine.* **60** (4): 471-485.
- 257. Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., et al. 1998.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 3140-3145.
- 258. Marchandin, H., Jean-Pierre, H., De, C.C., et al. 2000.** Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 213-6.
- 259. Marra, A.R., Pereira, C.A., Castelo, A., do Carmo Filho, J.R., Cal, R.G., Sader, H.S., Wey, S.B. 2006.** Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. *Int J Infect Dis.* **10** : 56-60.
- 260. Marshall, C., Richards, M., Black, J, et al. 2007.** A longitudinal study of *Acinetobacter* in three Australian hospitals. *The Journal of hospital infection* . **67** (3): 245-252.
- 261. Martin, C. 2007.** Bactéries à Gram négatif non fermentaires. In : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson . Paris. P : 330-343.
- 262. Masi, M., Pages, J. M., Pradel, E. 2003.** Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux pump. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **786** :197-205.

- 263. Mataseje, L.F., Bryce, E., Roscoe, D. , Boyd, D. A. , Embree, J. , Gravel, D. , Katz, K. , Kibsey, P. , Kuhn , M., Mounchili , A. , Simor, A. , Taylor, G. , Thomas, E., Turgeon, N., Mulvey, M.R. 2012.** Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *J Antimicrob Chemother* . **67**: 1359-67.
- 264. Mathlouthi,N. , Areig, Z., Al Bayssari, C., Bakour,S., Ali El Salabi A., BenGwierif, S., Zorgani,A.A., Ben Slama, K., Chouchani,C., Rolain,J.M. 2015.** Emergence of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Collected from Some Libyan Hospitals. *Microbial Drug Resistance* . **21**(3).
- 265. Mavroidi, A., Tzelepi,E., Tsakris,A., Miriagou,V., Sofianou,D., and Tzouvelekis,L.S.2001.** An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother* . **48**: 627-630.
- 266. Mazzariol, A., Mammina,C., Koncan, R., Di,G., V, Di,C.P., Cipolla,D. et al. 2011.** A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* . **17**: 722-724.
- 267. McGowan, J.E. 2006.** Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* . **34**:S29-37
- 268. McMurry, L., Petrucci, R.E., Levy, S.B. 1980.** Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.**77**: 3974-7.
- 269. McNeil, S.A., Nordstrom-Lerner, L., Malani, P.N., Zervos, M., Kauffman, C.A. 2001.** Outbreak of sternal surgical site infections due to *Pseudomonas aeruginosa* traced to a scrub nurse with onychomycosis. *Clin Infect Dis* . **33**(3):317-23.
- 270. Mellouk, F.Z., Bakour, S., Meradji, S., Al-Bayssari, C., Bentakouk, M.C., Zouyed, F., Djahoudi, A., Boutefnouchet, N., Rolain, J . M. 2017.** First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microbial Drug Resistance* . **23**(3): 335-344
- 271. Mennane, Z., Qasmaoui1, A., Sahraoui, H.L., Halout1, K., Hamamouchi1, J. , Khedid, K. , Bahbah, R., Bourchid, M., Baghdadi, N. and Charof, R. 2016.** Profil phénotypique et génotypique des entérobactéries d'origine hospitalière isolée à partir de quatre hôpitaux

- marocains durant 2011 et 2012. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. **15**:55-60.
- 272. Merad Boudia, E., 2014.** Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii*. Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid. Thèse de doctorat.
- 273. Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier, G., Claude, J.D., Timinouni, M. 2011.** Qnr and aac (6')-Ib-cr types quinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolated in Annaba, Algeria. *Pathol Biol*. **59**:73–8.
- 274. Meradjji, S., Barguigua, A., Bentakouk, M. C., Nayme, K., Zerouali, K., Mazouz, D., Chettibi, H., Timinouni, M., 2016.** Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria." *Burns*. **42**(4):906-18.
- 275. Merkier, A.K., Catalano, M., Ramirez, M.S., et al. 2008.** Polyclonal spread of *bla*_(OXA-23) and *bla*_(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries*. **2**: 235-40.
- 276. Mezhoud, H. 2011.** Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez des bactilles à Gram négatif isolés en médecine de ville. Université A /MIRA de Béjaia.P36.
- 277. Mesli, E., Berrazeg, M., Drissi, M., Bekkhoucha, S.N., and Rolain, J.M. 2013.** Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis* .**17**: e739-e743.
- 278. Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V. et al. 2008.** Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pahol Biol (Paris)*. **56**:319–25.
- 279. Miller,G.H., Sabatelli, F.J., Hare, R.S., Glupczynski,Y., Mackey,P., Shlaes, D. et al.1997.** The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis*. **24**: S46-S62.
- 280. Minchella, A., Molinari, L., Alonso, S. , Bouziges, N., Sotto, A., and Lavigne, J.-P. 2010.** Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. *Pathologie Biologie*. **58**(1):1-6 .
- 281. Moolenaar, R.L., Crutcher, J.M., San Joaquin, V.H., Sewell, L.V., Hutwagner, L.C., Carson, L.A., et al. 2000.** A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal

- intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? *Infect Control Hosp Epidemiol.* **21**(2):80-5.
- 282. Moquet, O., Bouchiat, C., Kinana, A., Seck, A., Arouna, O., Bercion, R., Breurec, S., Garin, B. 2011.** Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*, Senegal. *Emerging Infectious Diseases* **17**:143-144.
- 283. Moubarek, C., Brémont, S., Conroy, M.C., Courvalin, P., Lamber, T. 2009.** GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**: 3579-3581.
- 284. Mugnier, P., Casin, I., Bouthors, A.T., and Collatz, E. 1998a.** Novel OXA-10-derived extended-spectrum beta-lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. **42**: 3113-3116.
- 285. Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. 2010.** Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* **16**: 35-40.
- 286. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfatter, M.A., et al. 1999.** Manual of clinical Microbiology. 7th ed. *American Society for Microbiology*, Washington DC. p. 442-458.
- 287. Naas, T., Bentchouala, C., Cuzon, G., Yaou, S., Lezzar, A., Smati, F., et al. 2011.** Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* **38**:135-9.
- 288. Naas, T., Bentchouala, C., Lima, S., Lezzar, A., Smati, F., Scheftel, J.M., et al. 2009.** Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* Senftenberg isolates from Algeria. *J Antimicrob Chemother*. **64**:866-8.
- 289. Naas, T., Coignard, B., Carbone, A., Blanckaert, K., Bajolet, O., Bernet, C., Verdeil, X., Astagneau, P., Desenclos, J. C., and Nordmann, P. 2006a.** VEB-1 extended-spectrum β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis*. **12**: 1214-1222.
- 290. Naas, T., Fortineau, N., Nordmann, P. 2008.** Diffusion de *Acinetobacter baumannii*

- multiresistant dans les établissements de santé : situation actuelle en France et mesures de contrôle. *Hygienes*. **6**: 481-491.
- 291.Naas, T. , Lezzar, A., Bentchouala, C., Smati, F., Scheftel, J.M., Monteil, H., et al. 2005.** Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Senftenberg isolates producing CTX-M beta-lactamases from Constantine, Algeria. *J Antimicrob Chemother*. **56**:439–40.
- 292.Naas, T., Nordmann, P.1999.** OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des*. **5**: 865-879.
- 293.Naas, T., Poirel, L., Karim,A., and Nordmann, P.1999b.** Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. **176**: 411-419.
- 294.Nagano, N., Nagano, Y., Cordevant, C., Shibata, N. , and Arakawa, Y. 2004.** Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol*. **42**: 3978–3984.
- 295.Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M. et al. 2012.** Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med Mal Infec*. **42**:20–9.
- 296.Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., Timinouni, M. 2013.** Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* strains in Algeria. *J Infect Dev Ctries*. **7** (11):804-811.
- 297.Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L. 2004.** Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol*. **53**(12):1233-1240.
- 298.Neonakis,I.K., Scoulica,E.V., Dimitriou,S.K., Gikas,A.I., and Tselentis,Y.J. 2003.** Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. *Microb Drug Resist*. **9**: 161-165.
- 299.Neuwirth, C., Siebor, E., Duez, J.M., Péchinot, A., and Kazmierczak, A. 1995.** Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillinbinding proteins. *J Antimicrob Chemother*. **36**(2): 335–342.
- 300.Nikaido, H. 2000.** Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clin Microbiol Infect*. **6**: 22-26.

- 301.Niang, O. 2003.** Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires . Thèse Pharm., Dakar, n° 60.
- 302.Nordmann P. 2003.** Mécanismes de résistance aux bétalactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales françaises d'Anesthésie et Réanimation*. **22**: 527-530.
- 303.Nordmann, P, Boulanger, A.E., Poirel, L. 2012.** NDM-4 metallo-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. **56**(4): 2184–2186
- 304.Nordmann, P., Carrer, A. 2010.** Les carbapénèmes des Entérobactéries. *Archives de Pédiatrie* **17**(4): S154–S16.
- 305.Nordmann, P., Cuzon, G., and Naas, T. 2009.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria,” *The Lancet Infectious Diseases*. **9** (4):228–236.
- 306.Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L. 2011.** Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. **17**(10): 1791–1798.
- 307.Nordmanna, P., Poirel, L. 2013.** Multirésistance aux antibiotiques : l'émergence des entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Revue Francophone des Laboratoires* . **449**:35–37
- 308.Nordmann, P., Poirel, L. 2014.** The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin. Microbiol. Infect.* **20** :821-830.
- 309.Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T. , Duport, C., Michel-Briand, Y. and Labia, R. 1993.** Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* . **37** :962-969.
- 310.Ocampo-Sosa, A.A., Cabot,G., Rodriguez,C., Roman,E., Tubau,F., Macia,M.D. et al.2012.** Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. **56**: 1703-1713.
- 311.OMS. 2005. Organisation mondiale de la santé-Genève.** Endiguer la résistance aux antimicrobiens. Perspectives politiques de l'OMS sur les médicaments.1-6.

- 312.OMS. 2008. Organisation mondiale de la santé-Genève :** Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à échelle Nationale. Selon les recommandations de l'OMS. 5eme Ed. P.109
- 313.Ouedraogo, A.S., Dakoure, P. W. H., Coulibaly S., Sanon, B. G., Cessouma, R., Gea, P., Nacro, B. 2011.** Aspects bactériologiques des infections ostéo-articulaires non tuberculeuses de l'enfant au centre hospitalier universitaire Sourô Sanou de Bobo Dioulass = Bacteriological aspects of child non tuberculosis osseous infections at university hospital Souro Sanou, Bobo Dioulasso. *Médecine d'Afrique noire* **58**(1) : 36-40.
- 314.Parveen, M., R., Harish, B.N., Parija, S.C. 2010.** AmpC beta lactamases among Gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**: 1517-8382.
- 315.Park, S.H., Byun, J.H., Choi,S.H., Lee,D.G., Kim,S.H., Kwon,J.C., Park, C., Choi, J.H. and Yoo, J.H.2012.** Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in the community and hospital in Korea: emergence of ST131 producing CTX-M-15. *BMC Infectious Diseases*. **12**:149
- 316.Paterson, DL. 2006.** Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*. **34**:S20–8.
- 317.Paterson, D.L., Bonomo, R.A. 2005.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* .**18**: 657-686.
- 318.Paton, R., Miles, R. S. , Hood, J. and Amyes, S. G. B. 1993.** ARI-1: β -lactamase mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. **2**: 81–88.
- 319. Patzer, J.A., Dzierzanowska, D. 2007.** Increase of imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Polish paediatric hospital 1993-2002. *Int J Antimicrob Agents*. **29**:153-158.
- 320. Patzer, J., Toleman, M.A., Deshpande, L.M. , Kaminska, W., Dzieranowska, D. , Bennett, M.B., Jones, R.N., and Welsh, T.R. 2004 .** *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 genecassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001) . *J Antimicrob Chemother* . **53**: 451-56.
- 321.Pechère, J.C., Kohler, T. 1999.** Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. **5**(1): S15-S18.

- 322.Pechère, J.C., Micha-Hamzhepour, M., Kohler, T., 1998.** L'efflux antibiotique, un mécanisme de résistance multiple chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Académie nationale de médecine*. **182** (3): 599-615.
- 323.Peleg, A.Y., Franklin, C., Walters., L.J., Bell, J.M., Spelman, D.W. 2008.** OXA-58 and IMP-4 carbapenemhydrolyzing beta-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**: 399-400.
- 324.Peleg, A. Y., Seifert, H., et al. 2008 a.** *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. **21**: 538-582.
- 325. Péan, Y., Gauzit , R., Lalaude , O., Robert , J. 2006.** Activité de l'ertapénème et d'autres antibiotiques sur les bacilles aérobies à Gram négatif isolés d'infections respiratoires et abdominales d'origine communautaire en France 2003. *Antibiotiques* . **8**(4) :275-279.
- 326.Pfeifer, Y., Cullik, A., and Witte, W. 2010.** Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens, *International Journal of MedicalMicrobiology*. **300**(6): 371–379.
- 327.Philippon, A, Arlet, B. 2012.** Entérobactéries et 3-lactamines : phénotypes de résistance naturelle. *Pathologie Biologie*. **60** :112-126.
- 328.Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby, G.A. 2002.** Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. **46**: 1-11.
- 329.Philippon, A., Arlet, G. 2005.** Les β -lactamases chez les bacilles à Gram négatif : que de nouveautés en 15 ans ! *Elsevier Masson Paris Antibiotiques* .**7** :247-259.
- 330.Philippon A., Arlet G., 2006.** β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de biologie clinique*. **64** (1): 37-51.
- 331.Philippon, A. 1998.** *Pseudomonas aeruginosa* : phénotypes de résistance aux antibiotiques. *Méd Mal Infect* . **28** : 134-49.
- 332.Philippon,L.N., Naas,T., Bouthors,A.T., Barakett,V., and Nordmann,P.1997.** OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **41**: 2188-2195.
- 333.Picazo, J.J., Betriu, C., Rodriguez-Avial, I., Culebras, E., Gomez, M. , Lopez, F. 2006.** Antimicrobial resistance surveillance: Vira study 2006. *Microbiol Infect*. **24**:617-28.
- 334.Piddock, L.J. 1996.** Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother* . **38** :1-3.

- 335.Pilet, C., Bourdon, J.L., Toma, B., Marchal N., Balbastre,C. 1979.** Les entérobactéries Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne *Doins*, Paris, 2e ed: 109-187.
- 336.Pittet, D., Allegranzi, B., Sax, H., et al. 2006.** Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect. Dis.* **6** (10):641-652.
- 337.Poirel, L., Brinas,L., Fortineau,N., and Nordmann,P.2005c.** Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**: 3593-3597.
- 338.Poirel, L., Cabanne , L., Vahaboglu, H. , and Nordmann, P. 2005a.** Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase *bla* _{PER-1} gene in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**: 1708–1713.
- 339.Poirel, L., Gerome, P., De,C.C., Stephanazzi,J., Naas,T., and Nordmann,P. 2002a.** Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46** : 566-569.
- 340.Poirel, L., Héritier, C., Tolun, V., et al. 2004 a.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48** ;15-22.
- 341.Poirel, L., Lebessi,E., Castro,M., Fevre,C., Foustoukou,M., and Nordmann,P. 2004.** Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 2277-2279.
- 342.Poirel L., Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. 2008.** Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 1613-7.
- 343.Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., et al. 2000.** Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 891-7.
- 344.Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. 2010.** Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **54**(1): 24–38.

- 345.Poirel, L., Nordmann, P., 2006.** Résistance aux Beta-lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques*. **8**: 100-107.
- 346.Poirel, L., Nordmann, P. 2006 a.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology Infection*. **12**: 826-836.
- 347.Poirel, L., Nordmann. P. 2008.** *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms of resistance, multiple β -Lactamases. In Bergone-Bérénin, E., H. Friedman, and M. Bendinelli (eds). *Acinetobacter: Biology and Pathogenesis*. Springer science, New-York, Chap 7, pp. 129-143.
- 348.Poirel, L., Potron, A. and Nordmann, P.2012.** OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* .**67**: 1597-606.
- 349.Poirel, L., Weldhagen,G.F., De,C.C., and Nordmann,P. 2002b.** A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. **49**: 561-565.
- 350.Poirel, L., Weldhagen,G.F., Naas,T., De,C.C., Dove,M.G., and Nordmann,P. 2001b.** GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**: 2598-2603.
- 351.Pollini, S., Maradei, S., Pecile, P., Olivo,G., Luzzaro,F., Docquier,J.D., and Rossolini,G.M. .2013.** FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**: 410-416.
- 352.Poole, K. 2004.** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. **10**(1):12-26.
- 353.Poole, K. 2005.** Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**(2):479-87.
- 354.Potvin, É. 2007.** Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*. Collection mémoires et thèses électroniques. Université Laval.
- 355. Pournaras, P., Tsakris, A., Maniati, M., Tzouvelekis, L.S., and Maniatis, A.N. 2002.** Novel Variant (blaVIM-4) of the Metallo-Lactamase Gene blaVIM-1 in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* . *Antimicrob Agents Chemother* . **46**: 14026-4028.
- 356.Pournaras, S., Maniati, M., Petinaki, E. , Tzouvelekis, L.S., Tsakris, A., Legakis, N.J., and Maniatis, A.N. 2003.** Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa*

carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1409-14.

357.Qi, C., Malczynski, M., Parker, M., Scheetz, M.H. 2008. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol*.**46**: 1106-9.

358.Quinn, J. P., Dudek, E. J., DiVincenzo, C. A., Lucks, D. A., Lerner, S. A.1986. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Infectious Diseases*.**154** : 289-94.

359.Queenan, AM, Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. **20** :440-58.

360.Radoui, A., Fafa, A., Moktefi, A. 2015. Épidémiologie des exacerbations à germes bacilles Gram négatifs en pneumologie pédiatrique. *Revue des Maladies Respiratoires*. **32** : 156 .

361.Ramdani-Bouguessa, N., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Tazir, M., Canica, 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**:983–7.

362.Ramdani-Bouguessa, N., Mendonca, N., Leitao, J., Ferreira, E., Tazir, M., Canica, M. 2006. CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers. *Algeria J Clin Microbiol*.**44**:4584–6.

363.Ramos, A. J., Köhler, T., Nikaido, H. et al. 1999 .Invovement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agent Chemother* . **43** :2624-8.

364.Ramoul, A. 2013. Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses . these Universite Badji Mokhtar – Annaba, Faculte Des Sciences , Departement de Biochimie. , p. 44, 73,78.

365.Ramoul, A., Hammami, S., Dekhil, M., Aimiri,S.,Slim,A., and Boutiba-ben boubaker, I.2013.Phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug resistant *Acinetobacter Baumannii* from Algerien intensive care units. *African journal of Microbiology*.**7**(10) :8568-874.

366.Richard, C., Keredjian, M. 1995.Méthodes de Laboratoire pour l'identification des bacilles à Gram négatif aérobies stricts : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*. *Inst. Pasteur*. 2e édition. **2** : 22-26.

- 367. Riera, E., Cabot,G., Mulet,X., Garcia-Castillo,M., del,C.R., Juan,C. et al. 2011.** *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.* **66**: 2022-2027.
- 368. Riethmuller, J., 2013.** La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes. Université de Strasbourg. Faculte de Pharmacie de Strasbourg.
- 369.Rio, Y., Pina, P., Jurin, F., Allouch, P., Didion, J. , Chardon, H. 2002.**Sensibilité d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques, isolés chez des malades de soins intensifs français en 1998. phénotypes de résistance aux bétalactamines. Etude ESCRIME. *Pathologie Biologie.***50**:12-7.
- 370.Robin, F., Aggoune-Khinache, N. , Delmas, J., Naim , M., and Bonnet , R. 2010.** Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* .**54**: 466-70.
- 371.Robin, F., Gibold, L., Bonnet, R. 2012.** Résistances naturelles et acquises aux b-lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quoti-dienne. *Elsevier Masson SAS* **445**:47–58.
- 372.Rockstroh, T., 1977.**Changes in the nomenclature of bacteria after the 8th edition of Bergey's Manual of the Determinative Bacteriology. *Z Arztl Fortbild (Jena).* **71**: 545-50.
- 373.Roschanski, N., Fischer, J., Guerra, B., Roesler, U. 2014.** Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in *Enterobacteriaceae*. *PLOS ONE.* **9** (7): e100956.
- 374.Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M., Mugnaioli, C. 2008.** The spread of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* **14**:33-41.
- 375.Roy, D., 2000.** Identification et caractérisation de la région variable des intégrons de classe 1 identifiés chez différents isolats cliniques à Gram négatif et caractérisation du mécanisme de résistance aux 13-lactamines chez un isolat de *Salmonelle* isolé au Québec. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de maître des sciences (MSc.)
- 376. Ruiz, M., Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Vila, J.2007.** High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain, *Clinical Microbiology and Infection.* **13**(12): 1192-1198.

- 377.**Sader,H.S.,Farrell, D.J., Flamm, R.K., Jones,R.N.**2013.**Antimicrobial susceptibility of Gramnegative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* **78**(4):443-8
- 378.**Sanchez-saucedo, L. U., Gonzalez-yunez, R. A., Avila figueroa, C., Santos J. I. **1990.** Meningitis neonatal: observaciones sobre etiología, mortalidad y secuelas = Neonatal meningitis: observations on etiology, mortality and sequelae, *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* . **47**(11) :772-776 .
- 379.**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. **1992.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* . **24**: 104-8.
- 380.**Sassi, A., Loucif, L., Gupta, S. K., Dekhil, M., Chettibi, H., and Rolain, J. M. **2014.** NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:5606-5608.
- 381.** Sefraoui, I. **2015.** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien, These de Faculte Des Sciences De la nature et de la vie telmcen. P 38.
- 382.** Sefraoui, I., Berrazeg, M., Drissi, M., Rolain, J.M. **2014.** Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist.***20**:156-61.
- 383.**Seng,P., Drancourt,M., Gouriet,F., La,S.B., Fournier,P.E., Rolain,J.M. and Raoult,D. **2009.** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**:543-551.
- 384.**Shawn, V., Scott, A. C., Peggy, C. K., Patricia, J. S., Jayawant, N. M., Lolans, K., Hayden, M. K., and Robin P. **2013.** Comparison of a Novel, Rapid Chromogenic Biochemical Assay, the Carba NP Test, with the Modified Hodge Test for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 93097-3101
- 385.**Siarkou,V.I., Vitti,D., Protonotariou,E., Ikonomidis,A., and Sofianou,D. **2009.**Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 1325-1330.
- 386.**Siegrist, H.S.**2000.** *Acinetobacter spp* : Infection nosocomiales, épidémiologie et résistance aux antibiotiques. Swiss-Noso. Suisse.

- 387.****Sorin, M., Segal-Maurer, S., Marino, N. , Urban, C. , Combest, A., Rahal, J.J.** 2001. Nosocomial transmission of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* following bronchoscopy associated with improper connection to the steris system 1 processor. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **22**(7) :409-13.
- 388.****Sotto, A., Lemaire, X., Jourdan, N., Bouziges, N., Richard, J.-L., Lavigne, J.-P.** 2008. Activité in vitro de l'ertapénème vis-à-vis de souches bactériennes isolées de plaies infectées du pied chez des patients diabétiques. *Médecine et Maladies Infectieuses* .**38**(3):146–152.
- 389.****Sougakoff, W., Trystram, D.** 2003. Résistances aux β-lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène du CHU Pitié-Salpêtrière. Université Paris-VI.
- 390.****Souly, K.** 2006. Prévalence des souches *d'Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production de métallo-βeta-lactamases. Thèse de doctorat en Pharmacie à Rabat.. N°84.
- 391.****Spratt, B.G., Zhang, Q.Y., Jones, D.M., Hutchison, A., Brannigan, J.A., and Dowson, C.G.** 1989. Recruitment of a penicillin-binding protein in gene from *Neisseria flavaescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **86**(22): 8988-8992.
- 392.****Strateva, T., Yordanov, D.**2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* **58**: 1133-1148.
- 393.****Sunenshine, R.H., Wright, M.O., Maragakis, L.L., et al.** 2007. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerging infectious diseases.* **13** (1): 97-103.
- 394.****Tang, S.S., Apisarnthanarak, A., Hsu, L.Y.** 2014. Mechanisms of β-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev.* **78**:3-13
- 395.****Tan, S. Y., Chua, S. L. , Liu, Y. , Hoiby, N. , Andersen, L. P. , Givskov, M. , Song, Z. , and Yang, L.** 2013. Comparative genomic analysis of rapid evolution of an extreme-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone. *Genome Biol. Evol.* **5**:807-818.
- 396.****Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* **24**: 1596-9.

- 397.Thabet, L., Messadi, A. A., Meddeb, B., Mbarek, M., Turki, A., BEN REDJEB, S. 2010.** Profil bactériologique des infections urinaires chez la femme à l'Hôpital Aziza Othmana: étude à propos de 495 cas = Bacteriological profile of urinary tract infections in women in Aziza Othmana Hospital: A 495 cases study. *Tunisie médicale* . **88**(12) : 898-901.
- 398.Thamlaoui, M., Nazef, N., Hebili, F., Mahrane, H., Guechi, Z., Berrah, H. 2011** Épidémiologie des infections à bactilles à Gram négatif producteurs de bétalactamases à spectre élargi en réanimation pédiatrique. *Réanimation* . **20**:S77-S81.
- 399.Thomson, K.S., Moland, E.S. 2000:** the new β -lactamases of Gram negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect*. **2**: 1225–1235.
- 400.Touati, A., Benallaoua, S., Djoudi, F., Madoux, J., Brasme, L., De, C.C. 2007.** Characterization of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microb Drug Resist*. **13**:85–9.
- 401.Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., De, C.C. 2006.** First report of CTXM- 15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* . **27**:397–402.
- 402.Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J., De, C.C. 2008.** First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **60**:287–90.
- 403.Touati, A., Medboua, C., Touati, D., Denine, R., Brasme, L., de Champs, C. 2012.** CTX-M- 15-producing *Enterobacteriaceae* isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algeirs (Algeria). *Int Res J Microbiol*. **3**: 181–5.
- 404.Touati, A., Zenati, K., Brasme, L., Benallaoua, S., De, C.C. 2010.** Extended-spectrum betalactamase characterisation and heavy metal resistance of *Enterobacteriaceae* strains isolated from hospital environmental surfaces. *J Hosp Infect* . **75**:78–9.
- 405.Touati, M. 2013 .** Antibio-résistance des bactilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba These de Faculté des Sciences p. 66, 44.
-
- 406.Touati, M., Seydina , M.D., Dekhil,M., Djahoudi,A., Racherache,A., and Rolain,J.M. 2013.** Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**: 2426-2427.

- 407.**Touati, M., Seydina ,M.D., Dekhil , M. , Djahoudi, A. and Rolain, J.M. 2012. Emergence of blaOXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* .**40**: 89-91.
- 408.**Trabelsi, B., Hajjej, Z., Meddeb, B., Labben, I., Gharsallah, H., Ferjani, M. 2014. Caractéristiques clinico-épidémiologiques des infections à *Acinetobacter baumannii* en réanimation. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* .**33**(2) :A223–A224.
- 409.**Trias, J., Dufresne, J. Levesque, R. C., and. Nikaido, H. 1989. Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1201-1206.
- 410.**Trias, J., and Nikaido, H.1990b. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* **265**:15680-15684.
- 411.**Turmel, J.M. 2014. Évaluation des pratiques des médecins généralistes face aux infections urinaires à entérobactéries productrices de bêta lactamases à spectre élargi . Université de Poitiers ,Faculté de Médecine et Pharmacie, France p.22.2014.
- 412.**Van Looveren, M, Goossens, H. 2004. The ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*.**10**:(8)684-704.
- 413.**Van, M.R., Willems, R., Brimicombe, R., et al. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. *J Clin Microbiol.* **47**: 4096-101.
- 414.**Vaux, S., Carbonne, A., Thiolet, J.M., Jarlier, V., Coignard, B., Raisin and Expert Laboratories Groups. 2011. Emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill.* **16**(22): 1-7.
- 415.**Vidon, O., Bourdin, C. 2005. Bétalactamases à spectre étendu (BLSE). Intérêt porté aux CTX-M.sur le lien:umr5558-mq1.univlyon1.fr//BétaLactamasesSpectreEtendu? BétaLactamases.
- 416.**Viedma, E., Juan,C., Acosta,J., Zamorano,L., Otero,J.R., Sanz,F. et al.2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 4930-4933.

- 417.Vila, J. and Martinez, J. L.2008.** Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Curr Drug Targets.* **9:** 797-807.
- 418.Vila, J., Martí, S. and Sánchez-Céspedes, J. 2007.** Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* **59:** 1210-1215.
- 419.Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Jimenez de Anta, T. 1997.** Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* **39(6):**757-762.
- 420.Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A., Jimenez de Anta, T. 1995.** Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39(5):**1201-1203.
- 421.Walsh, T.R.2008.**Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* **21:**367-71.
- 422.Walsh, T.R. 2010.** Emerging carbapenemases ; a global perspective.*Int J Antimicrob Agents.***36 (13):** S8-14.
- 423.Wang, D.D., Sun,T.Y., and Hu,Y.J.2007.**Contributions of efflux pumps to high level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Chin Med J.* **120:** 68-70.
- 424.Watanabe, M., Iyobe, S. , Inoue, M. et al. 1991.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35 :** 147-51.
- 425.Wendpoulomdé Kaboré, A.D., Konaté, A., Bako, E., Serge Bagré, T., Boisramé, S., Chandad, F., Traoré, A.S., Barro, N., Sangaré, L. 2016.** Détection d'*Acinetobacter baumannii*, agent pathogène opportuniste et multirésistant dans les infections bucco-dentaires à Ouagadougou, Burkina Faso. *Med Buccale Chir Buccale* . **22:**105-112.
- 426.Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., et al. 1997.** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.* **35 (6):**1394-1397.
- 427.Williams, E.P., and Cameron, K. 1894.** Infection by the *Bacillus Pyocyaneus* a Cause of Infantile Mortality. *Public Health Pap Rep.* **20:** 355-360.

- 428.Wolf, B., Rey, L.C., Moreira, L.B., Milatovic, D, Fleer A, Verhoef J, Roord JJ .2001.** Carriage of gram-negative bacilli in young Brazilian children with community-acquired pneumonia. *Int. J. Infect. Dis.* **5**:155-9.
- 429.Wright, G.D. 1999 .** Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol.* **2**(5):499-503
- 430.Wroblewska, M.M., Dijkshoorn, L., Marchel, H., et al. 2004.** Outbreak of nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. *The Journal of hospital infection.* **57** (4): 300-307.
- 431.Wu, J.J., chen, H.M., ko, W.C., and wu, M.H. 2008.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis* in a Taiwanese university hospital, 1999 to 2005: identification of a novel CTX-M enzyme (CTX-M-66). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **60**(2):75-169.
- 432. Xia, S., Hendriksen, R. S., Xie, Z., Huang, L., Zhang, J., Guo, W., et al. 2009.** Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from infections in humans in Henan Province, China. *J. Clin. Microbiol.* **47** :401–409.
- 433.Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., and Arakawa, Y. 2014.** A preliminary survey of extended-spectrum -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan, *FEMS Microbiology Letters.* **184** (1):53-56.
- 434.Yamane,K., Doi,Y., Yokoyama,K., Yagi,T., Kurokawa,H., Shibata,N. et al. 2004.** Genetic environments of the rmtA gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 2069-2074.
- 435.Yamane, K., Wachino, J.I., Doi , Y., Kurokawa, H., and Arakawa, Y. 2005.** Global Spread of Multiple Aminoglycoside Resistance Genes. *Emerging Infectious Diseases.* **11**(11): 951-953.
- 436.Yardy, G.W., Cox, RA. 2001.** An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contaminated urodynamic equipment. *J Hosp Infect.* **47**(1):60-3.
- 437.Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J. et al. 2001.** Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem- resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **45**(4):1151–1161.

- 438.Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K. et al. 2003** Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* **362**: 1888-1893.
- 439.Yoshimura, F., Nikaido, H. 1982.** Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutés. *J Bacteriol.* **152**(2): 636-642.
- 440.Yong, D., Lee, K., Yum, J.H., et al. 2002.** Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallobeta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol.* **40**: 3798-801.
- 441.Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., et al. 2009.** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:5046-54.
- 442.Yusuf, E., Van, S., Meeren, D., Schallier, A., Piérard, D. 2014.** Comparison of the Carba NP test with the Rapid CARB Screen Kit for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* **33**(12): 2237-2240.
- 443.Yu, Y. S., Zhou, H., Yang, Q., Chen, Y. G., Li, L. J. 2007.** Widespread occurrence of aminoglycoside resistance due to ArmA methylase in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *J Antimicrob Chemother.* **60**: 454-455.
- 444.Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., Tsakris, A. 2013.** Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **41**: 11-19.
- 445.Zavarzin, G.A., Stackebrandt, E., Murray, R.G. 1991.** A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Cano I. Microbiol.* **37**: 1-6.
- 446.Zemmouri, A., Tarchouli, M., Benbouha, A., Lamkinsi, T., Bensghir, M., Elouennass, M., Haimeur, C. 2015.** Profil bactériologique du pied diabétique et son impact sur le choix des antibiotiques. *Pan African Medical Journal.* **20**:148
- 447. Zogheib, E., Dupont, H. 2005.** Entérobactéries multirésistantes. *Elsevier SAS.P* : 153-165. Sur le lien :
http://www.sfar.org/sfar_actu/ca05/html/ca05_13/ca05_13.htm#94992.



RESUMES

La résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif reste un problème important en Algérie et permet de devenir une préoccupation clinique majeure à l'avenir, par conséquent la surveillance locale continue de la résistance aux antibiotiques est cruciale. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'apparition et de déterminer le support génétique de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif isolés en milieu hospitalier dans trois villes de l'est Algérien :Annaba , Skikda et Guelma .

Une collection de 186 souches (entérobactéries 161 (84.4%) et 25 (13.3%) des bacilles à Gram négatif non fermentants) a été effectuée durant la période du mois de Mars 2013 jusqu' au mois de Mars 2015 , l'identification a été faite par la galerie API 20 (NE ou E) et par (MALDI-TOF MS). L'antibiogramme a été réalisé selon les recommandations du comité de la société française de microbiologie par la méthode de la diffusion des disques sur un milieu gélosé . Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par E-test. Les souches résistantes aux carbapénèmes ont été soumises aux différents tests phénotypiques : test d'Hodge, EDTA, et le Carba NP modifiée. La détermination des gènes de résistance ont été caractérisés par (PCR et séquençage) en utilisant: (*bla_{TEM}* , *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* et *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}* , *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}* , *bla_{OXA-58}* , *bla_{VIM}*) et le gène *OprD* . Enfin, l'étude de la clonalité par la technique *Multi-locus Sequence Typing* (MLST).

Toutes les souches ont montré un haut niveau de résistance à tous les antibiotiques principalement aux B-lactamine. Trente-six sur 186 (19,3%) étaient résistants aux carbapénèmes. Parmi eux, 11 hébergent les gènes de carbapénémase : *bla_{OXA-48}* (2 *Klebsiella pneumoniae*), *bla_{VIM-4}* (2 *Pseudomonas aeruginosa*), *bla_{NDM-1}* (2 *Acinetobacter baumannii*) et *bla_{OXA-23}* (5 *A. baumannii*), d'autres β-lactamases aussi ont été détectés: *bla_{CTX-M-}* (15/66/139), *bla_{SHV-}* (28/85/1/133) et *bla_{TEM-1}*. Toutes les *P. aeruginosa* imipenème résistante porte des mutations dans l' *OprD*, nous les divisons en 5 groupes (G1,G2,G3,G4,G5).

Le MLST a démontré la présence de ST(404 , 219) en *K. pneumoniae*, ST 2 et ST 85 en *A. baumannii* et ST (244, 1076, 241, 227 et 233) en *P. aeruginosa*. L'Analyse de la clonalité a montré une épidémie provoquée par le ST 244 chez *P. aeruginosa* dans le service des brûlés à Annaba et aussi une épidémie par le ST 1076 dans l'est Algérien.

Finalement, la détection de souches productrices de carbapénémases est essentielle, tant pour la prise en charge thérapeutique que pour la prévention et le contrôle de l'infection. En effet, les infections par ces souches étant associées à des taux de mortalité et de morbidité plus élevés, les reconnaître chez un patient donné peut aider à adapter l'antibiothérapie

Mot clé : bacilles à Gram négatif - résistance aux antibiotiques-carbapénemase -BLSE- est Algérien

Resistance to antibiotics in Gram-negative bacilli remain a significant problem in Algeria and allows become a major clinical concern in the future, therefore the local continuous monitoring of antibiotic resistance is crucial. The objectives of this study is to evaluate the occurrence and determined the genetic support of antibiotic resistance in Gram-negative bacilli isolated in hospitals in three cities of eastern Algeria : Annaba, Skikda and Guelma.

A collection of 186 isolates (*Enterobacteriaceae* 161 (84.4%) and 25 (13.3%) of Gram negative bacilli non fermenting was conducted during the period from March 2013 to March 2015, the identification was made by the API 20 (NE or E) and (MALDI-TOF MS). Antimicrobial drug susceptibility was performed as recommended by the committee of the French society of Microbiology by the method of dissemination of disks on agar. The minimum inhibitory concentrations were determined by E-test. Isolates resistant to carbapenems were submitted to different phenotypic testing: Test Hodge, EDTA, and Carba NP modified. The determination of the resistance genes were characterized by (PCR and sequencing) using : (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{VIM}) and OprD gene. Finally, the study of clonality by Multi-Locus Sequence Typing technique (MLST).

All isolates have shown a high level of resistance to all antibiotics principalle to B-lactam antibiotics. Thirty-six of 186 (19.3%) were resistant to carbapenems. Among them, 11 harbored genes carbapenemase: *bla*_{OXA-48} (2 *Klebsiella pneumoniae*), *bla*_{VIM-4} (2 *P. aeruginosa*), *bla*_{NDM-1} (2 *Acinetobacter baumannii*) et *bla*_{OXA-23} (5 *A. baumannii*), other β-lactamases were detected: *bla*_{CTX-M-15/66/139}, *bla*_{SHV-28/85/1/133} et *bla*_{TEM-1}. All *P. aeruginosa* imepeneme resistance display mutations in the OprD, we divide them into 5 groups (G1, G2, G3, G4, G5).

MLST showed the presence of ST (404, 219) in *K. pneumoniae*, ST 2 and ST 85 in *A. baumannii* and ST (244, 1076, 241, 227 and 233) in *P. aeruginosa*. The clonality analysis has shown an epidemic caused by the ST 244 in *P. aeruginosa* in the service of burned in Annaba and as an epidemic by the ST 1076 in eastern Algeria.

Finally, the detection of strains producing carbapenemases is essential both for the therapeutic treatment for the prevention and control of infection. Indeed, infection by these strains are associated with higher rates of mortality and morbidity, know in a given patient can be helpful to antibiotics.

Keyword: Gram negative bacilli - antibiotic resistance-carbapenemase –ESBL- eastern Algeria

مقاومة المضادات الحيوية في عصيات سلبية الغرام ، لا تزال تمثل مشكلة كبيرة في الجزائر وسوف تصبح مصدر قلق سريري كبير في المستقبل ، وبالتالي فإن المراقبة المستمرة و المحلية لمقاومة المضادات الحيوية أمر بالغ الأهمية . الهدف من هذه الدراسة هو تقييم حدوث وتحديد الدعم الوراثي لمقاومة المضادات الحيوية في ال عصيات سلبية الغرام المعزولة في المستشفيات في ثلاث مدن من الشرق الجزائري هي عنابة ، سكيكدة ، قالمة .

تم جمع 196 سلالة من (161 entérobactéries (84.4%) و 25 عصيات سلبية الغرام الغير متراكمة (13.3%) خلال الفترة من شهر مارس 2013 حتى مارس 2015 ، تم التعريف بها بواسطة API 20 E و NE و ب (MALDI-TOF) ، اختيار الحساسية تم إجراءه وفقاً لتوصيات اللجنة الفرنسية لعلم الأحياء الدقيقة من خلال طريقة نشر الأقراص على الإجراء . ثم تحديد الحد الأدنى لتركيز المثبتة باستعمال E-TEST . العزلات المقاومة Carbapenemell تم وضعها على عدة اختبارات مظهرية ، اختبار EDTA ، Hodge و NP carba ، المعدل ، تحديد الجينات المسؤولة عن المقاومة ثم استخدام تقنية PCR و séquancage باستخدام:

bla_{TEM} ، *bla_{SHV}* ، *bla_{CTX-M}* et *bla_{OXA-48}* ، *bla_{KPC}* ، *bla_{NDM}* ، *bla_{OXA-23}* ، *bla_{OXA-24}* ، *bla_{OXA-58}* *bla_{VIM}* ، OPRD . أخيراً دراسة قابلية التنسيل بواسطة تقنية MLST و

أظهرت جميع السلالات مستوى عال من المقاومة لجميع المضادات الحيوية بشكل رئيسي لل betalactamines 36 من carbapénèmes من بينها 11 تستضيف جينات :

(*Pseudomonas aeruginosa* 2) *bla_{vim-4}* , (*Klebsiella peneumoniae* 2) *bla_{oxa-48}* و أخيراً تستضيف (*A. baumannii* 5) *bla_{oxa-23}* , (*Acinetobacter baumannii* 2) *bla_{Ndm-1}*

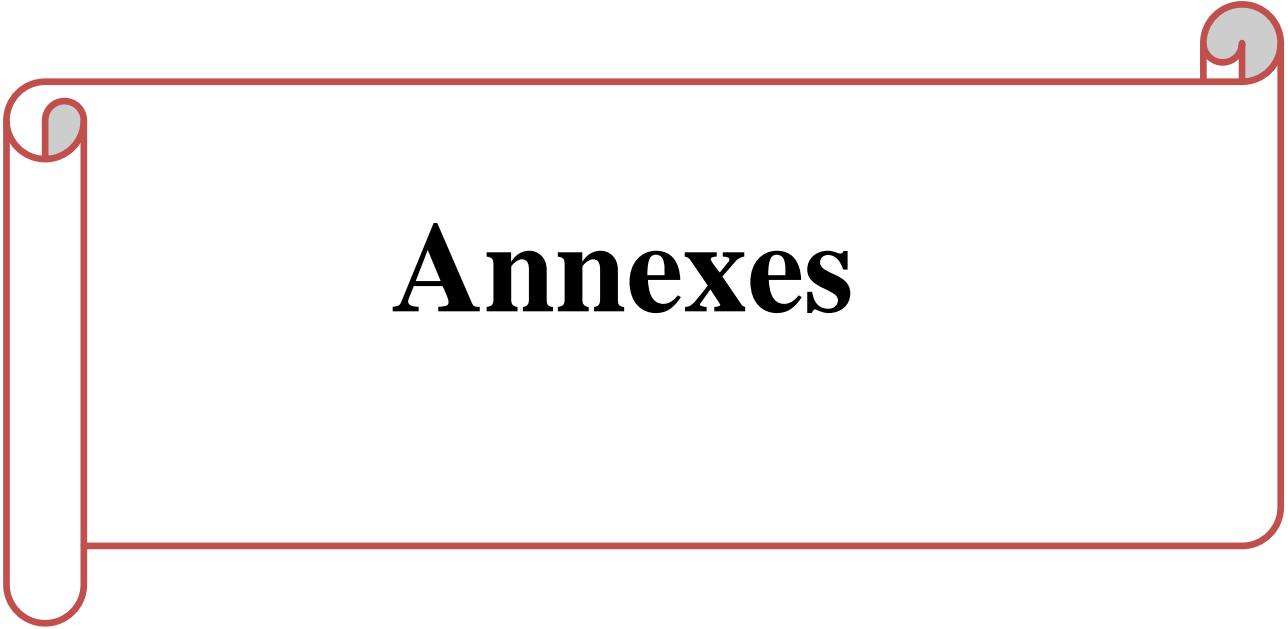
Bla_{tem-1} , *bla_{sav}* (28/85/1/133) , *bla_{ctxm-(15/16/139)}* betalactamases

كل *P. aeruginosa* المقاومة لل imepeneme حيث تم تقسيمها إلى 5 مجموعات (G1/G2/G3/G4/G5)

أظهرت MLST وجود ST233 (219-404) في *K.pneumoniae* في ST85-ST2 في *A.baumannii* و ST244 في *P.aeruginosa* و أظهر تحليلاً قابلية التنسيل وجود وباء 244 ST في 1076. 241. 227. في فرع الحروق في عنابة وأيضاً وباء آخر من قبل ST 1076 في شرق الجزائر

أخيراً الكشف عن السلالات المنتجة لل carbapenemases أمر ضروري بالنسبة للعلاج الوقائي والسيطرة على العدو في الواقع، العدو عن طريق هذه السلالات ترتبط مع ارتفاع معدلات الوفيات والإصابة بالأمراض ومعرفة الكمية المعطاة للمرضى يمكن أن تكون مفيدة للعلاج بالمضادات الحيوية

الكلمات المفتاحية: عصيات سلبية الغرام - مقاومة المضادات الحيوية - BLSE- carbapenemase . شرق الجزائر .



Annexes

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

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

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

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

Annexe 3

Tableau : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches cliniques des entérobactéries productrices des BLSE et des carbapénèmases :

souches	Lieu	Date d'isolement	Service	Origine	IMP	ETP	MHT	MCNP	BLSE	Carbapénèmase	MLST	
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	Annaba	07-2014	Bloc	Pus	S	R	+	-	CTX-M-15	-	NT
	7	Annaba	04-2014	Bloc	Pus	S	R	-	-	-	-	NT
	3	Skikda	07-2013	Bloc	Pus	S	R	-	-	CTX-M-15, TEM-1	-	NT
	6	Skikda	07-2013	Néonatalogie	Urine	S	R	+	-	CTX-M-15, TEM-1	-	NT
	11	Skikda	08-2013	Chirurgie générale	Pus	S	R	-	-	CTX-M-15, TEM-1	-	NT
	1	Skikda	06-2013	Traumatologie	Urine	S	R	-	-	CTX-M-15, TEM-1	-	NT
	5	Guelma	05-2013	médecine Interne	Urine	S	R	-	-	CTX-M-15	-	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	Skikda	03-2015	Bloc	Pus	S	R	+	+	CTXM-15, SHV-133	OXA-48	ST 404
	58	Annaba	01-2015	Burlés	Pus	S	R	+	+	CTXM-15, SHV-85	OXA-48	ST 219
	56	Skikda	03-2015	Pédiatre	Hémoculture	S	R	-	-	CTX-M-15	-	NT
	11	Annaba	07-2013	Pédiatre	Urine	S	R	-	-	CTX-M-139, TEM-1, SHV-28	-	NT
	05	Skikda	07-2013	médecine Interne	Urine	S	R	+	-	CTX-M-15, TEM-1, SHV-1	-	NT
	10	Annaba	08-2013	Néonatalogie	Urine	S	R	-	-	CTX-M-66, TEM-1	-	NT

<i>Escherichia coli</i>	24	Skikda	06-2014	Néonatalogie	Urine	S	R	-	-	CTX-M-15	-	NT
	25	Annaba	11-2014	médecine Interne	Pus	S	R	-	-	TEM-1	-	NT
	51	Guelma	05-2013	médecine Interne	Urine	S	R	-	-	CTX-M-15	-	NT
	60	Guelma	05-2013	médecine Interne	Urine	S	R	-	-	CTX-M-15, TEM-1	-	NT
	6	Skikda	10-2013	Néonatalogie	Urine	S	I	-	-	CTX-M-139	-	NT
<i>Serratia marcescens</i>	4	Annaba	07-2013	médecine Interne	Pus	S	R	-	-	CTX-M-15	-	NT
	8	Annaba	05-2013	Pédiatre	Pus	S	I	+	-	CTX-M-15	-	NT

IMP: Imipeneme ; ETP: Ertapeneme ; MHT: Hodge test modifiée ; MCNP: Carba NP modifiée ; MLST: multilocus sequence typing; NT: Non testé.

Annexe 4

Tableau : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des 16 souches cliniques résistantes à l'Imipénème de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* productrices des BLSE et des carbapénèmases :

Souches		Lieu	Date d'isolement	Service	Origine	IMP	CMI IMP mg/L	MHT	EDTA test	MCN P	BLSE	Carbapénémase	Mutation OPRD	MLST
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	ANNABA	03-2014	Brûlés	Pus	R	>32	-	-	-	-	-	G1(TAG _{40,137})	ST 244
	ALG -2	SKIKDA	03-2014	Pédiatre	Pus	R	>32	+	+	+	-	VIM-4	G2(TGA _{60,190})	ST 1076
	3	ANNABA	12-2014	Brûlés	Pus	R	>32	-	-	-	-	-	G3(TAG ₁₃₄)	ST 241
	4	ANNABA	12-2014	Brûlés	Pus	R	>32	-	-	-	-	-	G4(TGA ₆₄)	ST 227
	5	ANNABA	12-2014	Brûlés	Pus	R	>32	-	-	-	-	-	G5(TGA ₁₈₀)	ST 233
	11	ANNABA	12-2014	Brûlés	Pus	R	>32	-	-	-	-	-	G1(TAG _{40,137})	ST 244
	ALG-19	ANNABA	12-2014	Brûlés	Pus	R	>32	+	+	+	-	VIM-4	G2(TGA _{60,190})	ST 1076
	20	ANNABA	12-2014	Brûlés	Pus	R	>32	-	-	-	-	-	G1(TAG _{40,137})	ST 244
<i>Acinetobacter baumannii</i>	23	ANNABA	12-2014	Brûlés	Pus	R	>32	-	-	-	-	-	G2(TGA _{60,190})	ST 1076
	1	ANNABA	03-2013	Chirurgie générale	Pus	R	>32	+	-	+	TEM-1	OXA-23	/	ST 2
	2	SKIKDA	06-2013	médecine Interne	liquide pleural	R	>32	+	+	+	-	NDM-1	/	ST 85
	4	ANNABA	12-2014	Bloc	Pus	R	>32	+	-	+	TEM-1	OXA-23	/	ST 2
	5	ANNABA	12-2013	médecine Interne	Pus	R	>32	+	-	+	TEM-1	OXA-23	/	ST 2
	6	ANNABA	02-2014	médecine Interne	Pus	R	>32	+	-	+	TEM-1	OXA-23	/	ST 2
	7	ANNABA	03-2013	Pédiatre	Pus	R	>32	+	+	+	-	NDM-1	/	ST 85
	8	ANNABA	03-2014	Bloc	Pus	R	>32	+	-	+	TEM-1	OXA-23	/	ST 2

CMI: concentrations minimales inhibitrices ; G1: insertion d'une nucléotide G dans les positions de nucléotides 40 et 137 conduisant à la formation de codon stop TAG dans l'OprD résultat en un polypeptide tronqué de 200 acides amines résidus , G2: insertion de C dans les positions de nucléotides 60 et 190 conduisant à l'apparition d'un codon stop TGA en l'OprD résultat en un polypeptide tronqué de 64 acide aminé résidus, G3: insertion de G dans la position nucléotidiques 134 conduisent à l'apparition d'un codon stop TAG à l'OprD résultat en un polypeptide tronqué de 153 acide aminé résidus, G4: insertion de C dans la position nucléotidique 64 conduisent à l'apparition d'un codon stop TGA en l' OprD résultat en un polypeptide tronqué de 89 acide aminé résidus, G5: insertion de C dans la position nucleotidique 180 conduisent à l'apparition d'un codon stop TGA en l' OprD résultat en un polypeptide tronqué de 222 acides aminés résidus

Annexe 5

First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria.

Mellouk Fatma Zohra, Bakour Sofiane, Meradji Sameh, Al-Bayssari Charbel, Bentakouk Mohamed Cherif, Zouyed Fatiha, Djahoudi Abdelghani, Boutefnouchet Nafissa, and Rolain Jean Marc. Microbial Drug Resistance. **23**(3): 335-344.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0032>

En ligne avant impression: **17 June 2016**

Publication : **Volume: 23 Issue 3: 1 avril 2017**

Nom du journal : **Microbial Drug Resistance**

Pays du journal: **Etats-Unis**

Latest Impact Factor* is 2.529

***2015 Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2016**

Editor: Alexander Tomasz, PhD ISSN: 1076-6294 • Published Bimonthly • Online ISSN: 1931-8448 Published Bimonthly

First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria

Fatma Zohra Mellouk,^{1,2} Sofiane Bakour,¹ Sameh Meradji,² Charbel Al-Bayssari,¹ Mohamed Cherif Bentakouk,³ Fatiha Zouyed,⁴ Abdelghani Djahoudi,⁵ Nafissa Boutefnouchet,² and Jean Marc Rolain¹

Purpose: The aim of the study was to investigate the prevalence and molecular support of carbapenem resistance in gram-negative bacilli clinical isolates collected between March 2013 and March 2015 in three cities (Annaba, Skikda, and Guelma) in northeastern Algeria. **Results:** One hundred eighty-six isolates were identified as *Enterobacteriaceae* (161), *Pseudomonas aeruginosa* (18), and *Acinetobacter baumannii* (7). Thirty-six of 186 (19.3%) were resistant to carbapenems. Among them, 11 harbored carbapenemase genes, including *bla*_{OXA-48} (2 *Klebsiella pneumoniae*), *bla*_{VIM-4} (2 *P. aeruginosa*), *bla*_{NDM-1} (2 *A. baumannii*), and *bla*_{OXA-23} (5 *A. baumannii*). In addition, other β -lactamases were detected: *bla*_{CTX-M-(15/66/139)}, *bla*_{SHV-(28/85/1/133)}, and *bla*_{TEM-1}. All imipenem-resistant *P. aeruginosa* displayed OprD mutations. Multilocus sequence typing demonstrated the presence of ST 404 and ST 219 in *K. pneumoniae*, ST 2 and ST 85 in *A. baumannii*, and ST (244, 1076, 241, 227, and 233) in *P. aeruginosa*. **Conclusion:** In this study, we report the first detection of *P. aeruginosa* ST 1076 harboring the *bla*_{VIM-4} gene in African countries in two cities (Annaba and Skikda) in northeastern Algeria. Additionally, we report the first detection of *bla*_{OXA-48} in *K. pneumoniae* ST 404 and ST 219 in Algerian cities (Annaba and Skikda).

Introduction

RAPID EVOLUTION of antibiotic resistance in bacteria is currently a worrying phenomenon in developing countries, particularly in some African countries, where antibiotic-resistant pathogens may have higher prevalence.¹ Algeria is a country in northern Africa, where recent antibiotic resistance data indicate a worrying situation. Indeed, the past 10 years have been marked by the emergence and spread of new resistance genes, particularly in the north of the country. Resistance has been observed mainly among different species of *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*.²

Carbapenems are a β -lactam group of drugs that are often used as antibiotics of last resort to treat infections resulting from multidrug-resistant gram-negative bacilli. Carbapenems are restricted to hospital use and are mainly prescribed for the treatment of nosocomial infections.

However, in recent years, this scenario has changed, with the emergence of carbapenem-resistant bacteria both in nonfermentative (*A. baumannii* and *P. aeruginosa*) and fermentative (*Enterobacteriaceae*) gram-negative bacilli.³

Carbapenemase enzymes have been reported extensively in *Enterobacteriaceae* around the world.

Currently, carbapenemases in *Enterobacteriaceae* are mainly found in *K. pneumoniae* and, to a much lesser extent, in *E. coli* and other Enterobacterial species, with a higher prevalence in southern Europe and Asia than in other parts of the world. Class D β -lactamases, also known as *bla*_{OXAs} for oxacillinas, have been detected in many gram-negative bacteria, including *Enterobacteriaceae*. The *bla*_{OXA-48} gene was initially identified in a *K. pneumoniae* isolate from Turkey in 2001.³ Since then, the occurrence of *bla*_{OXA-48} producers has been reported as the source of nosocomial outbreaks in many parts of the world, notably in Mediterranean countries: Croatia, Egypt, France, Greece,

¹Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), UM 63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

²Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée, Département de Biochimie, Université Badji Mokhtar-Annaba, Annaba, Algérie.

³Laboratoire de Réanimation Centre et le Traitement Burns, Annaba, Algérie.

⁴Laboratoire central d'EPH EL Hadjar, Annaba, Algérie.

⁵Département de Pharmacie, Université Badji Mokhtar-Annaba, Annaba, Algérie.

Israel, Italy, Lebanon, Libya, Slovenia, Spain, Tunisia, Morocco, and Turkey.³ Moreover, among the increasingly reported and commonly identified multi- or even pan-drug-resistant bacteria, *P. aeruginosa* holds an important place. Several types of metallo-β-lactamases (MBLs) have been described around the world in *P. aeruginosa* isolates (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, FIM, and NDM).⁴ The most frequent of the MBLs are the VIM types. These have been identified in carbapenem-resistant isolates of *P. aeruginosa* in European countries with coastlines on the Mediterranean basin: Italy, France, Greece, Spain, Croatia, and Turkey and from African countries: Tunisia, Kenya, Libya, South Africa,⁴ and Lebanon.⁵ The main porin for uptake of carbapenems in *P. aeruginosa* is the outer membrane protein, OprD. Inactivating mutations in the OprD gene represent the most common molecular mechanism known for conferring resistance to carbapenems.⁵

In Algeria, from the beginning of 2010, carbapenemases of the Ambler class D (OXA-23 and OXA-58) type or class B type, including VIM-19 enzyme, were considered to be the first carbapenemases detected in *A. baumannii*^{6,7} and *Enterobacteriaceae*,⁸ respectively. Following that other types of carbapenemase classes, B (VIM-2, NDM-1, and NDM-5 enzymes), A (KPC enzymes), and D (OXA-23, OXA-24, and OXA-48 enzymes), were reported, with some of them becoming endemic in Algeria (e.g., OXA-23 and NDM-1 in *A. baumannii*).^{7,9}

The objectives of the present study were therefore to investigate the prevalence and molecular support of carbapenem resistance in gram-negative bacilli from clinical isolates collected between March 2013 and March 2015 from patients in three cities (Annaba, Skikda, and Guelma) in northeastern Algeria.

Materials and Methods

Data collection

A total of 186 nonduplicated gram-negative bacilli strains were isolated from patients hospitalized between March 2013 and March 2015 in three cities (Annaba, Skikda, and Guelma) in northeastern Algeria. These strains were identified using API 20E (*Enterobacteriaceae*) and API 20NE (*P. aeruginosa* and *A. baumannii*) identification systems (bioMérieux) and were confirmed using a matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method (Microflex; Bruker Daltonics) as previously described.¹⁰

Antibiotic susceptibility testing

Antimicrobial drug susceptibility was determined using the disk diffusion method on Mueller-Hinton (MH) agar according to the Antibiogram Committee of the Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (www.sfm-microbiologie.org). Seventeen antibiotics were tested: amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ticarcillin/clavulanic acid, cefoxitin, cefotaxime, aztreonam, ceftriaxone, ceftazidime, imipenem, ertapenem, trimethoprim/sulfamethoxazole, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, fosfomycin, rifampicin, and colistin. The minimum inhibitory concentrations for imipenem were determined using the Etest method (ABbiodisk). Interpretations were made according to CA-SFM breakpoints.

Phenotypic detection of carbapenemases

Phenotypic detection of carbapenemase production was performed using the modified Hodge test (MHT), the

TABLE 1. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY IN GRAM-NEGATIVE BACILLI CLINICAL ISOLATES

Antibiotics	Resistance (%)									
	Enterobacteriaceae N=161								Gram-negative bacilli nonfermenters N=25	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amoxicillin	74.5	87.5	93.3	77.7	66.6	100	100	100	100	100
Amoxicillin/clavulanic acid	65.4	70	93.3	77.7	50	50	100	100	100	100
Ticarcillin/clavulanic acid	67.2	75	80	22.2	25	0	0	33.3	50	100
Cefoxitin	29	30	80	33.3	25	0	0	0	100	100
Cefotaxime	38.1	75	40	66.6	33.3	50	16.6	66.6	100	100
Aztreonam	38.1	62.5	33.3	44.4	8.3	0	0	0	33.3	71.8
Ceftriaxone	38.1	80	46.6	33.3	25	0	0	33.3	/	/
Ceftazidime	/	/	/	/	/	/	/	/	44.4	100
Imipenem	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100
Ertapenem	12.7	20	46.6	22.2	0	0	0	0	100	100
Amikacin	9	37.5	26.6	0	8.3	0	0	0	44.4	100
Gentamicin	25.4	57.5	26.6	0	8.3	0	0	33.3	50	100
Ciprofloxacin	27.2	37.5	6.6	0	0	0	33.3	66.6	38.8	100
Trimethoprim/sulfamethoxazole	56.3	72.5	26.6	22.2	83.3	0	16.6	66.6	100	100
Fosfomycine	0	52.5	26.6	11.1	8.3	0	33.3	66.6	100	100
Rifampicin	63.6	87.5	93.3	44.4	25	100	0	33.3	88.9	100
Colistin	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0

1: *Escherichia coli*, 2: *Klebsiella* spp., 3: *Enterobacter* spp., 4: *Serratia* spp., 5: *Proteus* spp., 6: *Citrobacter* spp., 7: *Morganella morganii*, 8: *Providencia* spp., 9: *Pseudomonas aeruginosa*, 10: *Acinetobacter baumannii*.

TABLE 2. PHENOTYPIC AND GENOTYPIC FEATURES OF ESBLs AND CARBAPENEMASE-PRODUCING *ENTEROBACTERACEAE* CLINICAL ISOLATES

	<i>Isolate</i>	<i>Location</i>	<i>Date of isolation</i>	<i>Ward</i>	<i>Type of swabs</i>	<i>IMP</i>	<i>ETP</i>	<i>MHT</i>	<i>MCNP</i>	<i>ESBL</i>	<i>Carbapenemase</i>	<i>MLST</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	Annaba	07-2014	Bloc	Wound	S	R	+	—	CTX-M-15	—	—
	7	Annaba	04-2014	Bloc	Wound	S	R	—	—	CTX-M-15, TEM-1	—	NT
	3	Skikda	07-2013	Bloc	Wound	S	R	—	—	CTX-M-15, TEM-1	—	NT
	6	Skikda	07-2013	Neonatology	Urine	S	R	+	—	CTX-M-15, TEM-1	—	NT
	11	Skikda	08-2013	General surgery	Wound	S	R	—	—	CTX-M-15, TEM-1	—	NT
	1	Skikda	06-2013	Traumatology	Urine	S	R	—	—	CTX-M-15, TEM-1	—	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	Guelma	05-2013	Internal medicine	Urine	S	R	—	—	CTX-M-15	—	—
	24	Skikda	03-2015	Bloc	Wound	S	R	+	+	CTXM-15, SHV-133	OXA-48	ST 404
	58	Annaba	01-2015	Burn unit	Wound	S	R	+	+	CTXM-15, SHV-85	OXA-48	ST 219
	56	Skikda	03-2015	Pediatric	Blood culture	S	R	—	—	CTX-M-15	—	NT
	11	Annaba	07-2013	Pediatric	Urine	S	R	—	—	CTX-M-139, TEM-1, SHV-28	—	NT
	05	Skikda	07-2013	Internal medicine	Urine	S	R	+	—	CTX-M-15, TEM-1, SHV-1	—	NT
<i>E. coli</i>	10	Annaba	08-2013	Neonatology	Urine	S	R	—	—	CTX-M-66, TEM-1	—	NT
	24	Skikda	06-2014	Neonatology	Urine	S	R	—	—	CTX-M-15	—	NT
	25	Annaba	11-2014	Internal medicine	Wound	S	R	—	—	TEM-1	—	NT
	51	Guelma	05-2013	Internal medicine	Urine	S	R	—	—	CTX-M-15	—	NT
	60	Skikda	05-2013	Internal medicine	Urine	S	R	—	—	CTX-M-15, TEM-1	—	NT
	6	Annaba	10-2013	Neonatology	Urine	S	I	—	—	CTX-M-139	—	NT
<i>Serratiamar</i>	4	Annaba	07-2013	Internal medicine	Wound	S	R	—	—	CTX-M-15	—	NT
	8	Annaba	05-2013	Pediatric	Wound	S	I	+	—	CTX-M-15	—	NT

ESBL, extended spectrum beta-lactamase; ETP, ertapenem; MCNP, imipenem; IMP, imipenem; MHT, modified Carba NP; MIC, minimum inhibitory concentration; MLST, multilocus sequence typing; NT, no tested.

TABLE 3. PHENOTYPIC AND GENOTYPIC FEATURES OF THE 16 IMIPENEM-RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUmannii* CLINICAL ISOLATES PRODUCING ESBLS AND CARBAPENEMASES

Isolates	Locations	Date of isolation	Ward	Type of swabs	MIC		EDTA test	MCNP	ESBL	Carbapenemase	Mutation OPRD	MLST
					IMP	IMP mg/L						
P. aeruginosa	Skikda	03-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	VIM-4	ST 244
		03-2014	Pediatric	Wound	R	>32	+	+	—	—	G1(TAG _{40,137})	ST 1076
		12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	G2(TGA _{60,190})	ST 241
		12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	G3(TAG ₁₃₄)	ST 227
		12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	G4(TGA ₆₄)	ST 233
ALG-19	Annaba	12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	G5(TGA ₁₈₀)	ST 244
		12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	G1(TAG _{40,137})	ST 1076
		12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	+	+	—	—	G2(TGA _{60,190})	ST 244
		12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	G1(TAG _{40,137})	ST 244
		12-2014	Burn unit	Wound	R	>32	—	—	—	—	G2(TGA _{60,190})	ST 1076
A. baumannii	Annaba	03-2013	General	Wound	R	>32	+	+	—	TEM-1	NDM-1	ST 2
		06-2013	Internal surgery	Plural Fluid	R	>32	+	+	—	OXA-23	/	ST 2
		12-2014	Bloc	Wound	R	>32	+	+	—	NDM-1	/	ST 85
		12-2013	Internal medicine	Wound	R	>32	+	+	—	TEM-1	OXA-23	ST 2
		02-2014	Internal medicine	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	OXA-23	ST 2
4	Annaba	03-2013	Pediatric	Wound	R	>32	+	+	—	TEM-1	NDM-1	ST 2
		03-2014	Bloc	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	OXA-23	ST 2
5	Annaba	12-2014	Internal medicine	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	OXA-23	ST 2
		02-2014	Internal medicine	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	OXA-23	ST 2
6	Annaba	03-2013	Pediatric	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	NDM-1	ST 2
		03-2014	Bloc	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	OXA-23	ST 2
7	Annaba	03-2013	Pediatric	Wound	R	>32	+	+	—	NDM-1	/	ST 85
		03-2014	Bloc	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	OXA-23	ST 2
8	Annaba	03-2013	Pediatric	Wound	R	>32	+	—	+	NDM-1	/	ST 85
		03-2014	Bloc	Wound	R	>32	+	—	+	TEM-1	OXA-23	ST 2

G1: insertion of G in nucleotide positions 40 and 137 leading to the premature stop codon TAG in oprD, resulting in a truncated polypeptide of 200 amino acid residues, G2: insertion of C in nucleotide positions 60 and 190 leading to the premature stop codon TGA in oprD, resulting in a truncated polypeptide of 64 amino acid residues, G3: insertion of G in nucleotide positions 134 leading to the premature stop codon TAG in oprD, resulting in a truncated polypeptide of 153 amino acid residues, G4: insertion of C in nucleotide positions 64 leading to the premature stop codon TGA in oprD, resulting in a truncated polypeptide of 159 amino acid residues, G5: insertion of C in nucleotide positions 180 leading to the premature stop codon TGA in oprD, resulting in a truncated polypeptide of 89 amino acid residues.

EDTA test, and modified Carba NP test (MCNP), as previously described.^{11,12}

Detection of antibiotic resistance genes

Gram-negative bacilli isolates were screened using standard and real-time PCR for the following carbapenem-hydrolyzing enzyme-encoding genes: *bla*_{OXA-48},¹³ *bla*_{VIM},¹⁴ *bla*_{NDM},¹⁴ *bla*_{KPC},¹⁵ *bla*_{IMP},⁵ *bla*_{OXA-58},¹⁶ *bla*_{OXA-24},¹⁶ *bla*_{OXA-23},¹⁶ and other β -lactamases: (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTXM})¹⁶ and *bla*_{OprD}.⁵

Sequencing of resistance genes

All amplified products obtained were sequenced to validate their identities. Both strands of the purified amplicons were sequenced using Big Dye terminator chemistry on an ABI 3130XL automated sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed using the ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation).¹⁷ PCR products of OprD were fully sequenced as described above, and the resulting sequences were compared with the PAO1 reference strain sequence.

Genotyping clinical isolates

The epidemiology of *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii* carbapenemase production was studied by multilocus sequence typing (MLST) as described.^{4,18} Isolates were attributed a sequence-type (ST) number according to the allelic profiles available on the Institut Pasteur's

MLST website (www.pasteur.fr/mlst) and PubMLST (www.pubmlst.org).

Results

Between March 2013 and March 2015, 186 gram-negative bacilli were collected from three hospitals in northeastern Algeria, including Annaba, *n*=114 (61.2%), Skikda, *n*=47 (25.2%), and Guelma, *n*=25 (13.4%). Identification using both API20NE or API20E (identification system) and MALDI-TOF MS led to the identification of 161 (86.5%) *Enterobacteriaceae* (54 *E. coli* [29%], 55 *Klebsiella* spp. [29.5%], 17 *Enterobacter* spp. [9.1%], 10 *Serratia* spp. [5.3%], 12 *Proteus* spp. [6.4%], 2 *Citrobacter* spp. [1.07%], 8 *Morganella morganii* [4.3%], and 3 *Providencia* spp. [1.6%]) as well as 25 (13.4%) nonfermenter species (18 *P. aeruginosa* [9.6%] and 7 *A. baumannii* [3.76%]). The strains were isolated from wounds (61.2%), urine (35.4%), bloodstream infections (2.1%), and pleural fluid (1%). These samples were recovered from various hospital units (internal medicine, general surgery, pediatrics, urology, traumatology, operating rooms, burns unit, accident and emergency, and neonatology).

The *Enterobacteriaceae* showed a high degree of resistance to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime, and rifampicin. All strains were resistant to at least one aminoglycoside, including gentamicin. A lower rate of resistance was observed for ertapenem and colistin (Table 1).

Of 161 *Enterobacteriaceae*, 20 (12.4%) were screened for carbapenemase based on their reduced susceptibility to

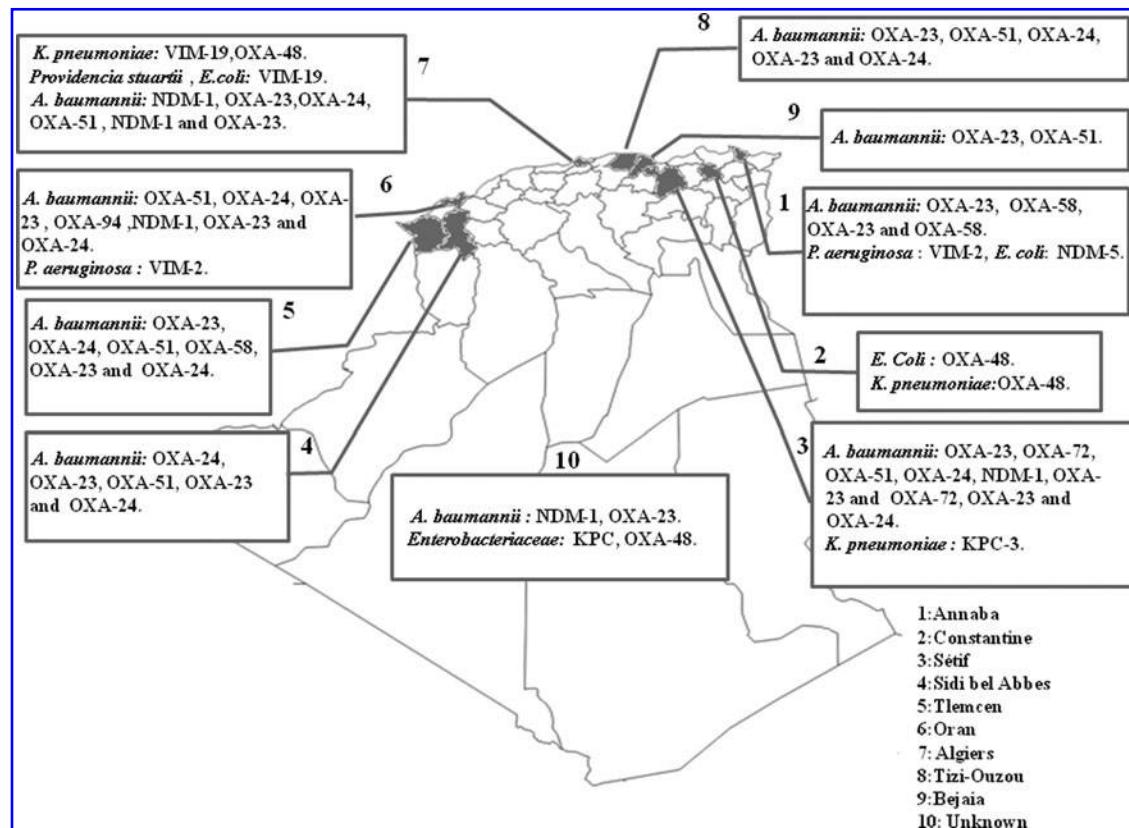


FIG. 1. Carbapenemase described in gram-negative bacilli clinical isolates from Algeria.

ertapenem (Table 2) and were included in the molecular biology study. Two *K. pneumoniae* isolates were positive by MHT and MCNP, *bla*_{OXA-48} was detected in these two isolates with ST 404 and ST 219. Neither *bla*_{KPC} nor *bla*_{NDM} gene was detected. A wide range of β -lactamases was found, and further analysis of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} indicated the presence of *bla*_{TEM-1} ($n=9$), *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-85}, *bla*_{SHV-1}, and *bla*_{SHV-133} in only four isolates. The *bla*_{CTX-M-15} gene was detected ($n=15$) and two isolates carried the *bla*_{CTX-M-139} gene and one *K. pneumoniae* carried the *bla*_{CTX-M-66} gene (Table 2).

In terms of the nonfermenter bacilli, the results of antibiotic susceptibility testing revealed that the isolates were resistant to almost all antibiotics, including β -lactams,

aminoglycosides, and fluoroquinolones. In addition, 100% of *A. baumannii* and 50% of *P. aeruginosa* isolates were resistant to imipenem. All isolates were susceptible to colistin except *Serratia* and *Proteus* species (Table 1).

Of the nine imipenem-resistant *P. aeruginosa* isolates, β -lactamase activity was inhibited by the EDTA in only two, and PCR revealed a *bla*_{VIM-4} gene in these isolates. None of the strains contained *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OX-23}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M} genes (Table 3). Due to various mutations, all carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates had a modification in the amino acid sequence of the OprD protein based on comparison with the PAO1 reference. Indeed, all isolates had modifications in their OprD gene sequence with insertion sequences at

TABLE 4. CARBAPENEMASES DETECTED IN CLINICAL ISOLATES DESCRIBED IN DIFFERENT CITIES IN ALGERIA

Species	Enzyme described	Number of isolates	Year	Location	Reference
<i>Enterobacteriaceae</i>	KPC	1	2010	Unknown	Vaux <i>et al.</i> ¹⁹
	OXA-48	1			
<i>E. coli</i>	VIM-19	1	2010	Algiers	Robin <i>et al.</i> ⁸
	NDM-5	3	2014	Annaba	Sassi <i>et al.</i> ²⁰
	OXA-48	1	2014	Constantine	Agabou <i>et al.</i> ²¹
<i>K. pneumoniae</i>	VIM-19	2	2010	Algiers	Robin <i>et al.</i> ⁸
	OXA-48	1	2014	Algiers	Aggoune <i>et al.</i> ²²
	KPC-3	1	2015	Sétif	Bakour <i>et al.</i> ¹⁵
	OXA-48	1	2015	Constantine	Cuzon <i>et al.</i> ²³
<i>Providencia stuarti</i>	VIM-19	2	2010	Algiers	Robin <i>et al.</i> ⁸
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	14	2013	Annaba	Touati <i>et al.</i> ²⁷
	VIM-2	2	2014	Oran	Sefraoui <i>et al.</i> ⁴
<i>A. baumannii</i>	OXA-58	16	2010	Tlemcen	Drissi <i>et al.</i> ⁶
	OXA-23	1	2010	Unknown	Mugnier <i>et al.</i> ⁷
	NDM-1	1			
	OXA-94	1	2012	Oran	Boulanger <i>et al.</i> ³⁶
	NDM-1	1	2012	Unknown	Bogaerts <i>et al.</i> ³⁷
	OXA-23,	22			
	OXA-58	1	2012	Annaba	Touati <i>et al.</i> ³⁸
	OXA-23 and OXA-58	1			
	OXA-23 and OXA-72	2	2012		
	OXA-23	29		Sétif	
	OXA-24	5			
	OXA-23	2	2012	Tizi-Ouzou	Bakour <i>et al.</i> ³⁹
	OXA-51	71	2012	Sétif and Tizi-Ouzou	
	OXA-23	40			
	OXA-24	3	2012	Tlemcen, Sétif, Sidi bel Abbes, oran, Tizi-Ouzou	Kempf <i>et al.</i> ⁴⁰
	OXA-23 and OXA-24	3			
	OXA-24,	17	2013	Tlemcen, Sidi bel	
	OXA-23	40		Abbes, oran	Mesli <i>et al.</i> ¹⁶
	NDM-1	5	2013	Oran	
	OXA-51	47	2014	Sétif, Algiers, Bejaia	
	OXA-23	33	2014	Algiers, Bejaia	
	OXA-24	10	2014		Bakour <i>et al.</i> ⁹
	NDM-1 and OXA-23	7	2014	Algiers	
	NDM-1	4	2014	Sétif	
	OXA-51	94	2015		
	NDM-1	10			
	OXA-24	19		Algiers	Khorsi <i>et al.</i> ⁴¹
	OXA-23	63			

different positions, leading to stop codons and causing mutations in the OprD gene sequences. Based on the mutations in OprD, the *P. aeruginosa* isolates could be classified into five groups (Table 3).

The MLST of *P. aeruginosa* revealed the presence of multiple clones (244, 1076, 241, 227, and 233) among the imipenem-resistant strains and which comprised strains from the hospitals of Annaba and Skikda with identical STs and identical OprD sequences. The compositions of these groups were as follows: G1, G2, G3, G4, and G5 were isolated from Annaba and consisted of ST 244, 1076, 241, 227, and 233, respectively. The G2 that was isolated from the Skikda Hospital consisted of ST 1076 (Table 3).

All imipenem-resistant *A. baumannii* tested were positive using MHT and MCNP and two of them tested were positive with the EDTA test. Carbapenemase genes were present in most *A. baumannii*, including *bla*_{OXA-23} (*n*=5), and only two isolates were positive for the *bla*_{NDM-1} gene. None of the strains contained the *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{IMP} genes. Furthermore, genotypic characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) revealed the identification of the *bla*_{TEM-1} gene in five strains. The clonal relationship of *A. baumannii* isolates based on MLST analysis showed the presence of ST 2 and 85 (Table 3).

Discussion

Over the past 10 years, we have seen a significant increase in antibiotic resistance in gram-negative bacilli in Algeria. The nature of this resistance is of increasing concern with the emergence of new resistance determinants such as carbapenemases (classes A [e.g., KPC enzymes], B [VIM and NDM enzymes], and D [OXA enzymes]). In Algeria, the first carbapenemase described in *Enterobacteriaceae* was VIM-19 in 2010.⁸ Following that the KPC gene was reported in *Enterobacteriaceae* in 2010¹⁹ and KPC-3 in *K. pneumoniae*

from a child's cerebrospinal fluid.¹⁵ Recently, Sassi *et al.* reported the detection of the *bla*_{NDM-5} gene in *E. coli*.²⁰ Oxacillinase-type OXA-48 was first identified in *Enterobacteriaceae* in 2010.¹⁹ The OXA-48 enzyme was detected in an *E. coli* isolate from a patient from a province bordering Tunisia²¹ and recently in a *K. pneumoniae* isolate from patients in Algiers²² and Constantine²³ (Fig. 1 and Table 4). In our document, we describe the first detection of OXA-48-producing *K. pneumoniae* ST 404 and ST 219 in two cities (Annaba and Skikda) in northeastern Algeria. These results indicate the spread of the *bla*_{OXA-48} gene to different regions in Algeria. *K. pneumoniae* ST 404 has been already reported in Korea²⁴ and ST 219 in Brazil.²⁵

In Algeria, few pieces of research have been conducted on the detection of OXA-48 enzyme. Routinely, in hospital laboratories, the use of imipenem antibiotic disks is more frequently used to detect OXA-48 than the other carbapenems such as ertapenem, but this enzyme confers high-level resistance to most β -lactam compounds, such as penicillins and cephalosporins, and variably affects carbapenems.²⁶ This was confirmed by our study, indeed, two OXA-48-producing *K. pneumoniae*, ST 404 and ST 219, which were resistant to ertapenem, were susceptible to imipenem.

For *P. aeruginosa*, only the *bla*_{VIM-2} gene has been identified in Algeria by Touati *et al.* in Annaba²⁷ and Sefraoui *et al.* in Oran⁴ (Table 4 and Fig. 1). In this study, only two *P. aeruginosa* harbored the *bla*_{VIM-4} gene (ALG_P19 from Annaba in a burns ward (GenBank accession no. KT698096) and the other ALG_P2 from Skikda in the pediatric ward (GenBank accession no. KT698097) (Table 3). The *bla*_{VIM-4} gene was first described in *P. aeruginosa* from Thessaly (Larissa, Greece), and this finding was followed by an outbreak in this institution.^{28,29} In another study, the *bla*_{VIM-4} gene was reported by Libisch *et al.* in Hungary from seven hospitals³⁰ as it was also reported in Poland,³¹ France,³² Sweden,³³ and Canada³⁴ (Fig. 2). Interestingly, a

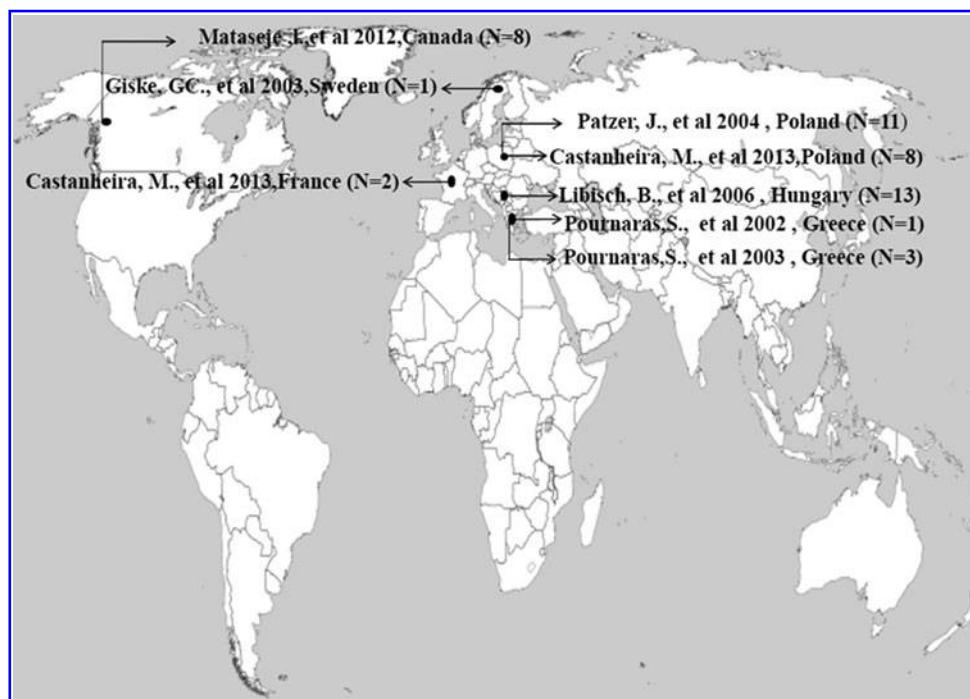


FIG. 2. Worldwide spread of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa*.

PubMed search failed to identify any published reports of coexpression of the *blaVIM-4* gene and OprD porin loss in identical clinical isolates of *P. aeruginosa* in North Africa. In this study, we report the first coexpression of the *blaVIM-4* gene and OprD in *P. aeruginosa* in two cities (Annaba and Skikda) in northeastern Algeria. These results indicate that the mutational inactivation of the OprD gene was the main mechanism for imipenem resistance in *P. aeruginosa*, as previously described.^{5,4} Likewise, MLST revealed the presence of multiple clones (ST244, ST1076, ST 241, ST 227, and ST233), and the results of this work are consistent in five countries within the Mediterranean basin.³⁵ The ST1076 and ST244 clones were most frequently in keeping with the studies by Sefraoui *et al.* in Algeria⁴ and Al-bayssari *et al.* in Lebanon⁵ (Table 3).

Similarly, in carbapenemase class B, NDM-1, the first carbapenemase, was identified in *A. baumannii* from Algerian patients transferred to France³⁶ and Belgium.³⁷ Following this, this enzyme was reported in western Algeria,¹⁶ in the Sétif and Algiers hospitals⁹ (Table 4 and Fig. 1). In the present study, two *A. baumannii* isolates produced the NDM-1 enzyme. This is the first result, showing the beginning of the spread of this enzyme in Annaba and Skikda. Of the oxacillinase enzymes, OXA-23 was the first enzyme to be found in *A. baumannii*.⁷ Following this, different groups of oxacillinases (OXA-24/72 and OXA-58) were described (Table 4 and Fig. 1). In the present study, five *A. baumannii* produced the OXA-23 enzyme, which has become endemic in Algeria. Finally, MLST analysis revealed the presence of two STs (2 and 85), which were found in *A. baumannii* from Algerian hospitals.¹¹ Our results suggest that these clones are now endemic within Algerian hospitals (Table 3).

In conclusion, our study reveals and confirms the dissemination of carbapenemase-producing gram-negative bacilli in Algerian hospitals and describes the first identification of VIM-4-producing *P. aeruginosa* ST 1076 and OXA-48-producing *K. pneumoniae* ST 404 and ST 219 in two cities (Annaba and Skikda) in northeastern Algeria. The emergence and spread of carbapenemase producers will limit the therapeutic options and threaten public health. Timely detection, implementation of infection control measures, formulation of an antibiotic policy, and preventive strategies to control dissemination of such strains are urgently required.

Data Access

The VIM-4 sequences of the two imipenem-resistant *P. aeruginosa* isolates have been deposited in GenBank under the accession numbers, KT698096 and KT698097.

Acknowledgments

The authors thank Linda Hadjadj for technical assistance and TradOnline for English corrections.

Funding Source

This work was partly funded by CNRS and IHU Méditerranée Infection.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933–951.
2. Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., and G. Arlet. 2014. News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathol. Biol. (Paris)* 62:169–178.
3. Djahmi, N., C. Dunyach-Remy, A. Pantel, M. Dekhil, A. Sotto, and J.P. Lavigne. 2014. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed. Res. Int.* 2014:305784.
4. Sefraoui, I., M. Berrazeg, M. Drissi, and J.M. Rolain. 2014. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb. Drug Resist.* 20:156–161.
5. Al-Bayssari, C., S.M. Diene, L. Loucif, S.K. Gupta, F. Dabboussi, H. Mallat, M. Hamze, and J.M. Rolain. 2014. Emergence of VIM-2 and IMP-15 carbapenemases and inactivation of oprD gene in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Lebanon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:4966–4970.
6. Drissi, M., L. Poirel, P.D. Mugnier, Z. Baba Ahmed, and P. Nordmann. 2010. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29:1457–1458.
7. Mugnier, P.D., L. Poirel, T. Naas, and P. Nordmann. 2010. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16:35–40.
8. Robin, F., N. Aggoune-Khinache, J. Delmas, M. Naim, and R. Bonnet. 2010. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:466–470.
9. Bakour, S., A. Touati, T. Bachiri, F. Sahli, D. Tiouit, M. Naim, M. Azouaou, and J.M. Rolain. 2014. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J. Infect. Chemother.* 20:696–701.
10. Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.E. Fournier, J.M. Rolain, and D. Raoult. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49:543–551.
11. Bakour, S., A.O. Olaitan, H. Ammari, A. Touati, S. Saoudi, K. Saoudi, and J.M. Rolain. 2015. Emergence of colistin- and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: First Case Report. *Microb. Drug Resist.* 21:279–285.
12. Bakour, S., V. Garcia, J.M. Brunel, A. Gharout sait, A. Touati, and J.M. Rolain. 2015. Rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a Modified Carba NP test. *New Microbes New Infect.* 7:89–93.
13. Al-Bayssari, C., A.O. Olaitan, F. Dabboussi, M. Hamze, and J.M. Rolain. 2015. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:745–746.
14. Diene, S.M., N. Bruder, D. Raoult, and J.M. Rolain. 2011. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37:544–546.

15. Bakour, S., F. Sahli, A. Touati, and J.M. Rolain. 2015. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes New Infect.* 3:34–36.
16. Mesli, E., M. Berazeg, M. Drissi, S.N. Bekkhoucha, and J.M. Rolain. 2013. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int. J. Infect. Dis.* 17:e739–e743.
17. Gupta, S.K., B.R. Padmanabhan, S.M. Diene, R. Lopez-Rojas, M. Kempf, L. Landraud, and J.M. Rolain. 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:212–220.
18. Bakour, S., S.A. Alsharapy, A. Touati, and J.M. Rolain. 2014. Characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates carrying bla(OXA-23) carbapenemase and 16S rRNA methylase armA genes in Yemen. *Microb. Drug Resist.* 20: 604–609.
19. Vaux, S., A. Carbone, J.M. Thiolet, V. Jarlier, and B. Coignard. 2011. Emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill.* 16:1–7.
20. Sassi, A., L. Loucif, S.K. Gupta, M. Dekhil, H. Chettibi, and J.M. Rolain. 2014. NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 5606–5608.
21. Agabou, A., A. Pantel, Z. Ouchenane, N. Lezzar, S. Khemissi, D. Satta, A. Sotto, J.P. Lavigne. 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:1641–1646.
22. Aggoune, N., H. Tali-Maamar, F. Assaos, N. Benamrouche, M. Naim, and K. Rahal. 2014. Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2:327–329.
23. Cuzon, G., C. Bentchouala, A. Vogel, M. Hery, A. Lezzar, F. Smati, L. Doret, and T. Naas. 2015. First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 46:725–727.
24. Kim, Y.A., Z.A. Qureshi, J.M. Adams-Haduch, Y.S. Park, K.A. Shutt, and Y. Doi. 2012. Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: emergence of sequence type 131. *Clin. Infect. Dis.* 55:224–231.
25. Andrade Leonardo, N.A., L. Stegani, J. Ferreira, C. Rodrigues, A.L. Darini, and L. Peixe. 2015. International clones (ST11/340/252, ST15, ST101), epidemic plasmids (IncFIIk, IncR, IncL/M) and virulence factors associated with CTX-M(-15, -8, -2) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. Abstract presented at the 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Copenhagen, Denmark 27 April Abstract no. P1523.
26. Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1597–1606.
27. Touati, M., S.M. Diene, M. Dekhil, A. Djahoudi, A. Racherache, and J.M. Rolain. 2013. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:2426–2427.
28. Pournaras, P., A. Tsakris, M. Maniati, L.S. Tzouvelekis, and A.N. Maniatis. 2002. Novel Variant (*blaVIM-4*) of the Metallo-β-Lactamase Gene *blaVIM-1* in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:14026–14028.
29. Pournaras, S., M. Maniati, E. Petinaki, L.S. Tzouvelekis, A. Tsakris, N.J. Legakis, and A.N. Maniatis. 2003. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants *blaVIM-2* and *blaVIM-4*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1409–1414.
30. Libisch, B., M. Muzslay, M. Gacs, J. Minarovits, M. Knausz, J. Watine, G. Ternak, E. Kenez, I. Kustos, L. Rokusz, K. Szeles, B. Balogh, and M. Fuzi. 2006. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:4220–4223.
31. Patzer, J., M.A. Toleman, L.M. Deshpande, W. Kaminska, D. Dzieranowska, M.B. Bennett, R.N. Jones, and T.R. Welsh. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *blaVIM-4* gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). *J. Antimicrob. Chemother.* 53:451–456.
32. Castanheira, M., L.M. Deshpande, A. Costello, T.A. Davies, and R.N. Jones. 2014. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–2011 in 14 European and Mediterranean countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 69: 1804–1814.
33. Giske, C.G., M. Rylander, and G. Kronvall. 2003. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3034–3035.
34. Mataseje, L.F., E. Bryce, D. Roscoe, D.A. Boyd, J. Embree, D. Gravel, K. Katz, P. Kibsey, M. Kuhn, A. Mounchili, A. Simor, G. Taylor, E. Thomas, N. Turgeon, M.R. Mulvey. 2012. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009–2010: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1359–1367.
35. Maatallah, M., J. Cheriaa, A. Backrouf, A. Iversen, H. Grundmann, T. Do, P. Lanotte, M. Mastouri, M.S. Elghmati, F. Rojo, S. Mejdi, and C.G. Giske. 2011. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* 6:e25617.
36. Boulanger, A., T. Naas, N. Fortineau, S. Figueiredo, and P. Nordmann. 2012. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 2214–2215.
37. Bogaerts, P., R. Rezende de castro, S. Roisin, A. Deplano, T.D. Huang, M. Hallin, O. Denis, and Y. Glupczynski. 2012. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 67: 1552–1553.
38. Touati, M., S.M. Diene, A. Racherache, M. Dekhil, A. Djahoudi, and J.M. Rolain. 2012. Emergence of *blaOXA-23* and *blaOXA-58* carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 40:89–91.

39. Bakour, S., M. Kempf, A. Touati, A.A. Ait, D. Haouchine, F. Sahli, and J.M. Rolain. 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J. Med. Microbiol.* 61:1341–1343.
40. Kempf, M., S. Bakour, C. Flaudrops, M. Berazeg, J.M. Brunel, M. Drissi, E. Mesli, A. Touati, and J.M. Rolain. 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 7:e31676.
41. Khorsi, K., Y. Messai, M. Hamidi, H. Ammari, and R. Bakour. 2015. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 8:438–446.

Address correspondence to:
Jean Marc Rolain, PharmD, PhD
Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et
Tropicales Émergentes (URMITE), UM 63, CNRS 7278,
IRD 198, INSERM 1095
IHU Méditerranée Infection
Faculté de Médecine et de Pharmacie
Aix-Marseille-Université
Marseille 13005
France

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