République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du Master en Microbiologie Moléculaire et Médicale

Thème

Caractérisation des phénotypes de résistance aux β-lactamines des souches d'Acinetobacter baumannii isolées à partir des prélèvements cliniques au niveau du CHU de Sétif

Réalisé par **M^elle^ BACHIRI Taous**

Membres de Jury

Dr K. BENDJEDOU	**MCB**	**Président**
Dr A. TOUATI	**MCA**	**Promoteur**
M^r^ S. BAKOUR	**DOCTORANT**	**Co –promoteur**
M^me^ K. BELHADI	**MAB**	**Examinatrice**
M^elle^ B. YANAT	**MAA**	**Examinatrice**

Promotion 2012/ 2013

J'adresse mes vifs remerciements à mon promoteur, Dr TOUATI A/Aziz et à mon Co-promoteur Mr BAKOUR Sofiane pour leur encadrement.
Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

Je remercie également Dr SAHLI Farida pour sa collaboration dans la réalisation de ce travail.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci à Melle MEZHOUD Halima et Melle BOUCHEFFA Karima pour leurs aide incontournable et leurs conseils. Qu'elles retrouvent ici ma plus sincère reconnaissance.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe du Dr TOUATI « Equipe de la Résistance » : Melle YANAT, Melle YOUSFI, Mme BELHADI, Mr BELMEHDI, Melle TAFOUKT, Melle BRAHMI, Melle MESBAH et Melle YAICI

Enfin, toute ma gratitude à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce document.

Ce modeste mémoire est dédié à...

Ma maman : Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Tes prières m'ont été d'un grand secours dans ma vie. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu as consentis depuis ma naissance,

Mon papa : Aucune dédicace ne saura exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi. Rien au monde n'est à la mesure des efforts que tu as fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices.

Papa Maman : Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes très chers frères : Hani, Massi et Mehdi. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte, je vous souhaite un avenir radieux

A ma grande sœur Dalia, qui m'a été d'une aide constante, m'a soutenue dans tous mes projets et entouré de ses précieux conseils et encouragements. Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A ma grand mère « Louiza », que dieu te protège

A la mémoire des mes grands parents maternels et paternels que ALLAH vous accueille dans son vaste paradis.

A toutes mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines, pour leurs soutien, leur amour, et leurs encouragements.

Mes chaleureuses dédicaces vont directement au club scientifique des Sciences de la Nature et de la Vie. Cette association, qui a toujours marqué le parcours des étudiants de la Facultés SNV, et qui ma donné de solides appuis afin de commencer ma vie professionnelle.

A mes très chers amies et amis : Celia, Karima, Rym, Assia, Amel, Djidja, Bicha, Soumaya, Halima, Dida, Iman, Marie, Kima, Malika, Mina, Bania, Ilyas, Halim, Takfa, Azdine, Nabil, Ahmed, Sofian, Aziz et à tous les autres. En témoignage de l'amitié qui nous unie et des souvenirs de tous les moments qu'on a passé ensemble, je vous dédie ce travail et vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur

A toute la promotion master II MMM

Taous

Sommaire

Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures
Introduction 01

Partie I : Matériel et Méthodes

1. Souches bactériennes 07
2. Etude de la sensibilité des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques 07
3. DD-Test (ou test de synergie) 08
4. Recherche de la production de carbapénémases 09
   4.1. Test de Hodge 09
   4.2. Recherche de la production de métallo β-lactamases (MβL) 09
5. Détermination des CMI de l'imipénème en milieu solide 10

Partie II : Résultats

1. Recueil des souches bactériennes 11
   1.1. Répartition des souches par services 11
   1.2. Répartition des souches par type de prélèvements 12
2. Résistance des souches aux antibiotiques 13
3. Analyse des phénotypes de résistance aux antibiotiques 16
   2.1. DD-test 16
   3.2. Production de carbapénémases 18
   3.3. Recherche de métallo-β-lactamases 18
4. Détermination des CMIs et recherche des oxacillinases 19
5. Déduction des phénotypes de résistance aux β-lactamines 20

Partie III : discussion et conclusion

Discussion 22

Conclusion 29

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Notre étude a pour objectif la caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques. Les phénotypes de résistance ont été déterminés sur la base des résultats des testes de sensibilité aux antibiotiques et aux inhibiteurs (Acide clavulanique, Cloxacilline, NaCl et EDTA).

Au total, 18 souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été collectées au niveau du CHU de Sétif dont 17 sont résistantes aux β-lactamines à spectre étendues. Parmi elles, 8 souches sont résistantes à l'imipénème. Concernant les autres familles d'antibiotiques, 14 souches sont résistantes à l'acide nalidixique, 11 à la ciprofloxacine et 2 à l'amikacine. Toutes les souches sont sensibles à la tobramycine et à la colistine. La résistance aux β-lactamines est due, soit à l'hyperproduction de l'AmpC naturelle, la production de β-lactamases à spectre étendu, oxacillinases ou Metallo- β-lactamases.

L'émergence des souches d'*Acinetobacter baumannii* multirésistantes représente un sérieux problème thérapeutique, d'où la nécessité de l'application rigoureuse des règles d'hygiène et l'usage rationnel des antibiotiques.

Mots-clés: Hôpital universitaire de Sétif, *Acinetobacter baumannii*, antibiotiques, phénotypes de résistance, β-lactamases.

Abstract

The aim of our study is the phenotypic characterization of the mechanisms of resistance of *Acinetobacter baumannii* strains to antibiotics.

Resistance phenotypes were determined on the basis for the results obtained in sensitivity tests to antibiotics and inhibitors. (clavulanic acid, cloxacillin, NaCl and EDTA).

A total of 18 *A. baumannii* strains were collected at the University Hospital of Sétif which 17 were resistant to broad-spectrum β-lactams. Among them, 8 strains were resistant to imipenem. For the other family of antibiotics, 14 strains were resistant to nalidixic acid, 11 to ciprofloxacin and 2 to amikacin. All strains were susceptible to tobramycin and colistin. Resistance to β-lactams is due either to the overproduction of natural AmpC, production of extended spectrum β-lactamases, oxacillinases or Metallo-β-lactamase.

The emergence of multidrug-resistant *A. baumannii* strains is a serious therapeutic problem, hence the need for strict enforcement of hygiene and the rational use of antibiotics.

Keywords: University hospital of Sétif, *Acinetobacter baumannii,* antibiotics, resistance phenotypes, β-lactamases.

DISCUSSION

RÉSULTATS

MATÉRIEL ET MÉTHODES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

CONCLUSION

INTRODUCTION

Liste des abréviations

AK : Amikacine
ATM : Aztréonam
BLSE : β-lactamase à spectre élargi
C1G : Céphalosporine de 1ère génération
C2G : Céphalosporine de 2ème génération
C3G : Céphalosporine de 3ème génération
C4G : Céphalosporine de 4ème génération
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CAZ : Céftazidime
CLS : céphalosporinases à large spectre
CLOX : Cloxacilline
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CS : Colistine
CTX : Céfotaxime
EDTA : Ethylène-diamine-tétra acétique
FEP : Céfépime
FOX : Céfoxitine
GES: Guyana Extended Spectrum
Gyr : Gyrase
***gyr* A :** Gène codant pour la sous-unité A de la gyrase
I : Intermédiaire
IMP : Imipenème
KPC *: Klebiella pneumoniae* carbapénemase
MβL : Métallo-β-lactamase
Omp : Outer membrane protein
OXA : Oxacilline
***par*C :** Gène codant pour la sous-unité C de la la topoisomérase IV.
PCR: Polymeras Chain Reaction
PER: Pseudomonas extended resistant
PIP : Pipéracilline
R : Résistant
RND : Resistance Nodulation cell Division
S : Sensible
SHV : Sulfhydryl reagent variable
SIM : Seoul imipenemase
TCC : Ticarcilline + acide clavulanique
TEM : Temoneira
TIC : Ticarcilline
TM : Tobramycine
VEB: Vietnam extended spectrum
VIM: Verona integron-encoded MBL

Liste des tableaux

Tableau N°I : Antibiotiques testés 08

Tableau N°II : Préparation de la gamme d'antibiotiques 10

Tableau N°III : Caractéristiques des souches d'*A.baumannii* recueillies..... 11

Tableau N°IV : Diamètres des zones d'inhibition (mm) ainsi que les profils de résistance des souches aux antibiotiques 14

Tableau N°V : Diamètres obtenus sur Muller Hinton et Muller Hinton à la cloxacilline... 17

Tableau N°VI : Résultats des CMIs 19

Tableau N°VII : Résultats de l'analyse des phénotypes de résistance aux β-lactamines ... 21

Tableau N°VIII : Taux de résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux différents antibiotiques testés comparait à quelques études sélectionnées..... 25

Tableau N°IX : Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Acinetobacter* spp. (Selon le CA-SFM, 2010)

Tableau X : interpretation des diamètres des zones d'inhibition pour l'aztréonam, selon le BSAC (BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICRIBIAL CHEMOTHERAPY : Methods for antimicrobial susceptibility testing; (Version Janvier 2006).

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des souches d'*Acinetobacter baumannii* recueillies par services 12

Figure 2 : Répartition des souches d'*Acinetobacter baumannii* par type de prélèvements . 12

Figure 3 : Taux de résistance des souches d'*Acinetobacter baumanii* aux différents antibiotiques testés..... 15

Figure 4 : Comparaison entre les profils de résistance globale des souches d'*A.baumannii* imipénème-sensibles et imipénème- résistantes 16

Figure 5 : image d'un DD-test positif sur gélose Muller Hinton additionnée de cloxacilline chez la souche d'*Acinetobacter baumannii* 980 16

Figure 6 : Hyperexpression de céphalosporinases chez la souche 949_a..... 18

Figure7 : Test de Hodge positif sur McConkey..... 18

Figure 8 : Résultat du test de synergie entre l'IMP et l'EDTA pour la souche 939 18

Figure 9 : Algorithme utilisé pour la déduction des phénotypes de résistance aux β-lactamines..... 20

Figure 10 : Nombre de publications trouvées dans PubMed de 1999 à la fin de 2010 24

Longtemps de classification incertaine, les bactéries du genre *Acinetobacter* sont actuellement incluses dans la famille des *Moraxellaceae*, ordre des *Pseudomonadales*, classe des *Gammaproteobacteria*, phylum des *Proteobacteria*, domaine des *Bacteria* (Euzéby, 2010). Leur identification a été précisée avec environ 30 espèces génomiques formant le genre *Acinetobacter* : l'espèce la plus fréquente et la plus résistante impliquée dans les infections est *Acinetobacter baumannii.* Cette dernière se présente, à l'examen direct, comme un bacille ou coccobacille à Gram négatif souvent associé par deux de 0.9 à 1.6 nm de diamètre, 1.5 à 2.5 µm de longueur. Elle est non fermentaire, non sporulée, parfois capsulée, immobile, aérobie stricte, à métabolisme respiratoire strict, catalase positive et oxydase négative (Towner, 2006 ; Peleg et *al.*, 2008). La température de croissance se situe entre 15°C et 44°C, constituant un critère essentiel dans le diagnostic différentiel entre espèces (Godineau Gauthey et *al*., 1988). L'isolement peut être obtenu sur des milieux conventionnels (gélose au sang, gélose « chocolat », gélose trypticase soja, etc.) et sur des milieux sélectifs des bacilles à Gram négatif comme la gélose de Mac Conkey ou la gélose Drigalski (Denis et *al*., 2007).

Ce sont des bactéries de l'environnement, capables d'utiliser une grande variété de substrats comme source de carbone, ce qui leur confère un habitat très large, en plus de leur présence dans une série de prélèvements cliniques, ces bactéries sont omniprésentes dans le sol, les eaux, les aliments et sont également des hôtes normaux de la peau humaine (20 à 25 % des individus sains sont porteurs) (Siegrist, 2000). Cette grande diversité facilite la transmission de ce germe, ainsi le manuportage constitue la voie de transmission la plus fréquente. La transmission via l'eau, la nourriture et le matériel hospitalier contaminé ont été également rapportés pour ce germe (Nordmann, 2004).

Bien que de pathogénicité limitée, ces bactéries se sont inscrites depuis 20 ans parmi les bactéries les plus redoutées dans les services de réanimation et sont considérées comme des agents d'infections nosocomiales sévères sporadiques ou épidémiques notamment chez des patients affaiblis (traumatismes multiples, cancer, immunodépression...) associées à une morbidité et une mortalité importantes (20 à 60%.), ainsi que dans la survenue de bactériémies, infections pulmonaires, méningites…etc (O'Shea, 2012). Les infections communautaires dues à ce germe, principalement pulmonaires, surviennent généralement sur un terrain débilité (tabagisme, alcoolisme, bronchite chronique, cancer, antécédents de pneumonie) (Doughari et *al*., 2011).

Plusieurs mécanismes de résistance à de multiples classes d'antibiotiques sont connus pour *Acinetobacter baumannii*. Il est naturellement résistant aux aminopénicillines, céphalosporines de 1ère et 2ème génération, ertapénème, fosfomycine, triméthoprime et

furanes. La production d'une β-lactamase de classe C d'Ambler, à bas niveau est à l'origine de la résistance naturelle de cette espèce aux aminopénicillines, à la céfalotine et à la céfoxitine (mais pas au sulbactam) (Bou et Martinez-Beltran, 2000). Cette céphalosporinase naturelle présente de nombreuses caractéristiques communes avec celles produites naturellement par *Pseudomonas aeruginosa* ou plusieurs entérobactéries. Cependant, contrairement à ces AmpC dont l'expression est inductible, l'expression de l'AmpC d'*A. baumannii* n'est pas inductible (absence du gène régulateur) (Poirel et Nordmann, 2008). De plus la production naturelle d'une oxacillinase appelée OXA-69 chez *A. baumannii* a été récemment identifiée. L'analyse de l'environnement génétique de bla_{OXA-69} n'a pas identifiée d'éléments de type intégrons/transposons susceptibles d'expliquer l'acquisition de ce gène (Poirel et Nordmann, 2006). L'analyse biochimique a montré que le spectre de substrat de cette oxacillinase est limité à quelques β-lactamines (pénicillines, céfalotine, oxacilline) mais comprenait également l'imipénème et le méropénème dans une plus faible mesure (Héritier et *al*., 2005). À noter que l'enzyme OXA-51, retrouvé chez des souches provenant de plusieurs pays d'Europe, est un variant ponctuel de OXA-69 avec 97% d'homologie (Brown et *al*., 2005).

En 2006, une étude a été menée par Fournier et Richet basée sur le séquençage et la comparaison du génome de deux souches d'*A. baumannii* (AYE et SDF), résistantes et sensibles respectivement. L'annotation et la comparaison du génome séquencé ont révélé que le génome de la souche résistante AYE renfermait une région de 86 kb appelée «Îlot de résistance» contenant un cluster de 45gènes de résistance. L'emplacement homologue dans la souche sensible présentait un îlot génomique de 20 kb qui est dépourvu de ces marqueurs de résistance (Fournier et Richet, 2006). Cette capacité à "changer" sa structure génomique démontre la grande plasticité génétique d'*A. baumannii*, qui le rend capable de bénéficier d'une grande variété de mécanismes de résistance lorsque la pression d'antibiotiques est constante (Giamarellou et *al*., 2008)

Le mécanisme le plus courant de résistance aux β-lactamines chez ce germe est la dégradation enzymatique par les β-lactamases (Peleg et *al.*, 2008). La description de résistances acquises aux pénicillines a été rapportée dès le début des années 1980 avec l'identification de la pénicillinase TEM-1 et TEM-2, et ensuite la pénicillinase CARB-5 (classe A d' Ambler) conférant un haut niveau de résistance aux amino- et carboxy-pénicillines. (Poirel et Nordmann, 2008).

L'AmpC naturelle d'*A. baumannii* peut être « surexprimée » en présence d'une séquence d'insertion (IS) appelée IS*Aba1* en amont du gène codant pour cette

céphalosporinase. Cette surexpression permet une élévation importante des CMIs des β-lactamines appartenant au spectre de substrat de cette enzyme (Poirel et Nordmann., 2008).

Contrairement à ce qui est observé chez les entérobactéries, la description de BLSE chez *A. baumannii* reste relativement rare (Poirel et Nordmann, 2008 et Peleg et *al*., 2008). Toutefois, plusieurs BLSE comprenant des enzymes de type TEM, SHV, CTX-M, GES, SCO, PER et VEB ont été décrites chez *A. baumannii* avec une prédominance des BLSE du type PER- 1 et VEB-1 (Peleg et *al.*, 2008 ; Gordon et Wareham, 2010)

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii* est devenue un phénomène mondial extrêmement préoccupant, car ces molécules sont souvent les seuls agents actifs contre les souches multirésistantes. Au cours des 10 dernières années, une augmentation de souches d'*A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes a été observée dans le monde entier (Kempf et Rolain., 2012).

Il existe trois types d'enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes rapportés chez *A. baumannii*. Il s'agit des carbapénèmases de type oxacillinases, des métallo-β-lactamases et des carbapénèmases de classe A d'Ambler. Quatre grands sous groupes d'oxacillinases ont été identifiés chez *A. baumannii*. L'OXA-23, OXA-40/24, OXA-58 et OXA-143. Outre l'oxacilinase naturelle de type OXA-51, la première oxacillinase capable d'hydrolyser l'imipénème fut l'OXA-23 identifiée initialement en Écosse en 1995 (Poirel et Nordmann, 2008). En Afrique, les souches d'*A. baumannii* productrices d'OXA-23 ont été retrouvées en Afrique du Sud, en Libye et en Egypte (Zarrilli et *al*., 2009). En Algérie, Mugnier et al., ont rapporté la première OXA-23 isolée à partir d'une souche d'*A. baumannii* en 2004 (Mugnier et *al*., 2010). Par la suite, l'OXA-23 a été rapportée chez une souche isolée au niveau du CHU de Annaba et qui renfermait à la fois le gène bla_{OXA-23} et bla_{OXA-58} (Touati et *al*., 2012) . Bakour et *al*., ont également rapporté des souches d'*A. baumannii* en Algérie renfermant le gène bla_{oxa-23} associé ou non à bla_{OXA-72}. L'enzyme carbapénèmase du type OXA-72 a été déjà signalée dans la région Asie-Pacifique, en Europe et en Amérique du Sud, mais pas en Afrique du Nord (Bakour et *al*., 2012).

Les enzymes OXA-58 sont le plus souvent identifiées en Amérique du Sud, la présence du gène bla_{OXA-58} a été observée chez d'autres souches issues d'autres pays d'Amérique latine et a été également trouvé en Europe (Bruno et *al*., 2012 et Zarrilli et *al*., 2009). En Algérie, le gène bla_{OXA-58} a été rapporté pour la première fois en Algérie par Drissi et *al*., chez douze isolats cliniques d'*A. baumannii* isolés au niveau du CHU de Tlemcen (Drissi et *al*., 2010). D'autres enzymes de ce type ont été rapportées (principalement en Europe) telle que l'OXA-24, qui est identique à l'OXA-40, et ayant 60% d'homologie avec l'OXA-23 (Zarrilli et *al*., 2013).

L'analyse du support génétique des gènes codant pour ces enzymes a montré une localisation chromosomique dans la plupart des cas mais une localisation plasmidique a été également démontrée pour les gènes codant les enzymes OXA-23 et OXA-58 (Bakour et *al*., 2012 et Touati et *al*., 2012). Il s'agit de plasmides de haut poids moléculaires non-transférables par conjugaison. D'autre part, concernant l'environnement génétique de ces oxacillinases, ses gènes n'ont jamais été identifiés au sein de structures de type intégrons alors que ces mêmes structures sont paradoxalement à l'origine de la dissémination de la plupart des autre gènes d'oxacillinases à spectre de substrat restreint. Dans le cas d'OXA-23, la séquence d'insertion IS*Aba1* a été identifiée en amont du gène de cette oxacillinase (Poirel et Nordmann, 2008). En ce qui concerne l'environnement des gènes $bla_{\text{OXA-58}}$ retrouvés dans plusieurs souches d'*A. baumannii*, la structure identifiée est très originale car il a été détecté de part et d'autre de ces gènes en plus de la séquence IS*Aba1* des IS nouvelles dont IS*Aba2* (famille IS*3*) et IS*Aba3* (famille IS*1*). Cependant, il a été montré que ces séquences d'insertions (IS) n'étaient pas responsables de l'acquisition du gène $bla_{\text{OXA-58}}$ (He et *al*., 2011).

Il existe un autre type d'enzymes à l'origine de la résistance aux carbapénèmes, mais moins fréquemment identifiées chez *A. baumannii* comparé aux oxacillinases. Il s'agit des métallo-β-lactamases appartenant à la classe moléculaire B d'Ambler (Amudhan et *al*., 2012). La présence des MBL dans les isolats d'*A. baumannii* multirésistants est, dans certains cas, difficile à détecter, ce qui indique que leur contribution à la résistance aux carbapénèmes peut être sous-estimée. Ces enzymes hydrolysent les β-lactamines, y compris les carbapénèmes, mais pas l'aztréonam. Quatre types d'enzymes MBL ont été identifiés à ce jour chez *A. baumannii,* il s'agit des MBL de type-IMP, VIM, SIM et NDM. Ces enzymes confèrent un niveau de résistance élevé aux carbapénèmes, avec des CMI supérieures à 256 mg/l dans la plupart des cas. Ces MBL sont codées par des gènes qui se situent la plupart du temps au sein des intégrons de classe 3. Par conséquent elles sont très souvent associées avec des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques, en particulier les aminosides (Zarrilli et *al*., 2013).

Enfin, la MBL décrite plus récemment, NDM-1, a été détecté en 2010 chez une souche d'*A. baumannii* isolée en Inde et a également été décrite en Allemagne, Belgique, Bangladesh, Chine et en République tchèque. Par ailleurs, une autre variante NDM, dite NDM-2, a été retrouvée chez un isolat d'*A. baumannii* provenant d'Égypte et des Émirats Arabes Unis. Les gènes bla_{NDM-1} et bla_{NDM-2} retrouvés chez une souche d'*A.baumannii* isolée en Europe sont portés par le transposon Tn125. Toutefois, le gène bla_{NDM-1} retrouvé chez une souche d'*A. baumannii* isolée en Chine est porté par un plasmide transférable par conjugaison (Zarrilli et

al., 2013). En Algérie, la première MBL de type NDM-1 retrouvée chez *A.baumannii* a été isolée chez un patient algérien hospitalisé au niveau d'une unité de soin intensif de l'hôpital d'Oran pour un grave traumatisme crânien suite à un accident de circulation puis transféré aux soins intensifs de l'hôpital Bicêtre en Juillet 2011 (Boulanger et *al*., 2012). Mesli et al. ont également décrit une MBL de type NDM-1 chez cinq souches d'*A. baumannii* isolées chez des patients hospitalisés au niveau de l'unité de soins intensifs du CHU d'Oran entre Avril et Août 2011, et ils ont confirmé que les patients n'avaient effectué aucun voyage à l'étranger (Mesli et *al*., 2013).

L'analyse de l'environnement génétique de bla_{NDM-1} a révélé la présence d'une séquence IS*Aba125* sur les deux côtés du gène bla_{NDM-1} et l'extraction plasmidique a révélé la présence d'un plasmide de 150 kb qui ne s'est pas hybridé avec la sonde bla_{NDM-1} spécifique, cela suggère que le gène bla_{NDM-1} est susceptible d'avoir un emplacement chromosomique, tel que décrit pour d'autres isolats d'*A. baumannii* producteurs de NDM (Mesli et *al*., 2013).

En outre, les carbapénèmases de classe A d'Ambler telles que KPC et GES, sont essentiellement détectées chez les entérobactéries et *P. aeruginosa*. Récemment, une nouvelle β-lactamase de type GES-11 a été détectée pour la première fois chez une souche d'*A. baumannii* résistante aux carbapénèmes isolée en France (Moubareck et *al*., 2009). L'enzyme confère une résistance aux β-lactamines, y compris l'aztréonam et une sensibilité réduite aux carbapénèmes. Le gène de structure est retrouvé au niveau d'un intégron de classe 1 porté par un plasmide auto-transférable. Bogaerts et *al*., soulignent le fait que les souches d'*A. baumannii* exprimant le gène bla_{GES} pourraient maintenant se disséminer de façon indépendante dans différentes régions du monde et indiquent qu'avec les β-lactamases de type KPC, récemment signalées chez un *Acinetobacter* isolé à Puerto Rico, ces deux types d'enzymes peuvent désormais représenter un mécanisme supplémentaire de résistance aux carbapénèmes chez la souche d'*A. baumannii* (Bogaerts et *al*., 2010).

Le rôle de l'absence ou la modification de porines dans la résistance aux carbapénèmes est fortement probable. La perte d'une protéine membranaire d'environ 22 kDa a été rapportée par plusieurs équipes comme vraisemblablement impliquée dans la résistance. Alors que la démonstration d'une relation entre la perte d'une protéine de membrane externe (OMP) de 29 kDa et la résistance aux carbapénèmes avait été établie. La même équipe a montré que l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes des souches d'*A. baumannii* multirésistantes était liée à l'inactivation d'un gène codant pour une porine dénommée CarO (Nordmann, 2010). De manière intéressante, chez certaines souches résistantes étudiées, cette inactivation résultait de l'insertion des éléments transposables IS*Aba285* et IS*Aba125,* deux séquences d'insertion nouvellement identifiées (Gordon et Wareham, 2010).

D'autre part, il existe chez *A. baumannii* un ou deux systèmes d'efflux dont certains ont une incidence sur la pénétration des antibiotiques, en particulier les aminosides (Courvalin et *al.*, 2006). L'identification du système d'efflux de type RND a montré que l'activité des β-lactamines pouvait être affectée en cas de surexpression. Ce mécanisme ne semble cependant pas être seul responsable des phénotypes de résistance couramment observés, mais jouerai un rôle important en association avec d'autres mécanismes. (Zarrilli et *al.*, 2009 ; Gordon et Wareham, 2010).

La virulence croissante et le développement rapide de la multirésistance par les souches d'*Acinetobacter baumannii* souligne la nécessité de rechercher des solutions de rechange pour la chimiothérapie. Plusieurs études sur la caractérisation des mécanismes de résistance des bactéries à Gram négatives ont été entreprises sous la direction du Docteur Touati A. depuis quelques années au niveau du laboratoire d'Ecologie Microbienne à l'Université de Bejaia et plusieurs travaux on été publiés concernant les Entérobactéries et les *Acinetobacter* (Touati et *al., 2006 ;* Bakour et *al., 2012).* C'est dans cette optique que nous proposons d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques ainsi que de caractériser les phénotypes de résistance aux β-lactamines chez des souches d'*A. baumannii* isolées au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Sétif.

Afin de développer cet aspect, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Collecte de souches d'*A.baumannii* à partir du laboratoire de bactériologie du centre hospitalo-universitaire de Sétif.
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques.
- Détermination des phénotypes de résistance.
- Détermination des CMIs.

1. Souches bactériennes

Durant la période août 2011 à mars 2013, des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de patients hospitalisés dans différents services du Centre Hospitalo-Universitaire de Sétif et de divers prélèvements pathologiques, ont été collectées.

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies :

- ✓ Sexe du patient.
- ✓ Age du patient.
- ✓ Type et date de prélèvement.
- ✓ Service d'hospitalisation.

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* collectées ont été identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Sétif à l'aide de galeries API 20 NE (Bio-Mérieux, France). Les souches collectées sont ensuite conservées puis acheminées vers le laboratoire de microbiologie de l'Université de A/MIRA, Béjaia.

2. Etude de la sensibilité des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques

2.1. Antibiogramme standard

La sensibilité des souches d'*A. baumannii* est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010). Les antibiotiques testés sont donnés dans le tableau N°I.

L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CFA-SFM (communiqué du CFA-SFM, 2010) pour tous les antibiotiques sauf l'aztréonam, ce dernier est interprété selon le BSAC (BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY : Methods for antimicrobial susceptibility testing; (Version Janvier 2006) (**Annexe I**).

Tableau N°I : Antibiotiques testés (de marque Oxoid)

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µg)	Famille
Céftazidime	CAZ	30	**C3G**
Céfotaxime	CTX	30	**C3G**
Céfépime	FEP	30	**C4G**
Imipénème	IMP	10	**Carbapénèmes**
Pipéracilline	PIP	100	**Ureidopénicillines**
Ticarcilline	TIC	75	**Carboxypénicillines**
Ticarcilline-clavulanate	TCC	75+10	**Carboxypénicillines**
céfoxitine	CX	30	**C2G (céphamycine)**
Aztréonam	ATM	30	**Monobactames**
Colistine	CS	30	**Polymexines**
Tobramycine	TM	10	**Aminosides**
Amikacine	AK	30	**Aminosides**
Acide nalidixique	AN	30	**Aminoside**
Ciprofloxacine	CIP	**5**	**Fluoroquinolones**

3. Recherche de la production de β-lactamases à spectre étendu

3.1. DD-test

Le test de synergie est utilisé pour la détection des β-lactamases à Spectre Etendu (BLSE) selon la méthode de Jarlier et *al*. (1988). Ce test consiste à placer des disques de

céftazidime, céfotaxime, céfépime et d'aztréonam à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque de TCC (ticarcilline-clavulanate).

La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une synergie entre les disques d'oxymino-β-lactamine et le disque contenant ticarcilline-acide clavulanique. Cependant cette BLSE peut être masquée du fait de l'induction de la céphalosporinase naturelle d'*A. baumannii* par le clavulanate. Dans ce cas, nous avons effectué le DD-test sur une gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline (500 µg/ml) (communiqué du CFA-SFM, 2010)

4. Recherche de la production de carbapénémases

4.1. Test de Hodge

Un disque d'imipénème est appliqué au centre d'une boîte de Mac conkey (MC) préalablement ensemencée avec une souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922. Ensuite, les souches à tester sont ensemencées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte en présence d'un témoin positif et d'un autre négatif (Hodge et *al.,* 1978) . Après 24h d'incubation à 37 °C, le test de Hodge est interprété comme positif par la présence d'une distorsion de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E.coli* (Lee et *al*., 2010).

4.2. Recherche de la production de métallo β-lactamases (MβL)

- **Méthode des disques combinés**

Un antibiogramme est réalisé, pour les souches d'*A. baumannii* de sensibilité diminuée à l'IMP, en utilisant un disque d'imipénème (10µg) additionné de 4 µl d'une solution d'EDTA (à 0,5 M, pH 8), ce dernier est déposé suffisamment distant d'un disque vierge contenant 4µl de la solution d'EDTA ajouté comme témoin, avec un autre disque d'imipénème seul sur la même boite de Pétri renfermant le milieu Mueller Hinton (Ait el Kadi et *al.*, 2006).

Après 16–18 h d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont mesurés et comparés entre eux. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM–EDTA est supérieur à celui obtenu avec les disques d'EDTA et d'IMP seuls d'au moins 6mm sont considérées comme souches productrices de MßL (Yong et *al.*, 2002) .

- **Recherche de synergie**

Un DD-test est réalisé avec un disque d'imipénème (10µg) déposé à 15mm d'un disque vierge imbibé de 10 µl de solution d'EDTA à 0,5 M, pH 8 (Jeong et *al.*, 2006).

La présence d'une MβL est détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA qui est un inhibiteur des MβL.

5. Détermination des CMI de l'imipénème en milieu solide

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

L'antibiotique testé est l'imipénème, la poudre de ce dernier est dissoute dans du tampon phosphate à 0,01M, pH 7 **(Annexe II)**. Les solutions d'antibiotiques sont préparées suivant le tableau N°II :

Tableau N°II: Préparation de la gamme d'antibiotiques (CA-SFM, 1995 version 2).

			Concentration	
Solution initiale (mg/L)	**Solution mère (ml)**	**Volume de diluant**	**Obtenue (mg/L)**	**Finale (mg/L) Dans le milieu**
5120	4	4	2560	256
5120	2	6	1280	128
5120	1	7	640	64
5120	1	15	320	32
320	4	4	160	16
320	2	6	80	8
320	1	7	40	4
320	1	15	20	2

- **Préparation des boîtes**

18 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont additionnés de 2 ml de chacune des différentes concentrations de l'imipénème préalablement déposés dans des boites de Pétri. Les mêmes étapes ont été suivie, mais avec ajout de NaCl avec une concentration finale de 200mM (Pournaras et *al.*, 2006). Après homogénéisation, les boites sont séchées 30 minutes à l'étuve.

- **Ensemencement**

Une suspension bactérienne est préparée en dissociant 3 à 5 colonies dans 3ml d'eau physiologique et une dilution de 1/100 ^{ème} est réalisée. 10 μl de la dilution sont déposés sur le milieu en 3 spots et les boites sont incubées à 37°C pendant 18 à 24h.

- **Lecture**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'ya pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies n'est pas prise en considération (CA-SFM, 1995 version 2).

1. Recueil des souches bactériennes

Au total, dix-huit souches d'*A. baumannii* ont été collectées au niveau du CHU de Sétif durant la période août 2011 à mars 2013. Les informations correspondant à ces souches sont données dans le tableau N°III :

Tableau N°III : Caractéristiques des souches d'*A. baumannii* recueillies.

Date	Code	Age	Sexe	Service	Prélèvement
23/08/2011	949	31ans	M	Réanimation	pvt trachéal
28/08/2011	678	3ans	M	Externe	urine
15/09/2011	980	80ans	F	Réanimation	pvt trachéal
20/09/2011	705	52ans	M	Réanimation	Hémoculture
10/10/2011	41	75ans	F	Réanimation	Sonde urinaire
19/07/2012	99	1an	F	Pédiatrie	LCR
12/10/2012	393	55ans	F	Néphrologie	ECBU
08/11/2012	719	58ans	M	Neurochirurgie	Hémoculture
12/11/2012	939	AD	M	Neurochirurgie	ECBU
26/12/2012	610	26ans	F	Externe	ECBU
02/02/2013	949 b	32ans	F	Infectieux	pus
08/02/2013	413	02 mois	M	Neurochirurgie	LCR
19/02/2013	451	02mois	M	Neurochirurgie	LCR
24/02/2013	517	21ans	M	Urgences Chirurgicales	LCR
27/02/2013	967	09 mois	M	Pédiatrie	Hémoculture
10/03/2013	644	24ans	M	Neurochirurgie	LCR
13/03/2013	62	79 ans	M	Infectieux	Hémoculture
17/03/2013	662	02 mois	F	Neurochirurgie	LCR

F : sexe féminin , **M** : sexe masculin, **pvt** : prélèvement, **LCR** : Liquide Céphalo-Rachidien, **ECBU** : Examen Cytobactériologique des Urines

1.1. Répartition des souches par services

On note d'après la figure 1 que les souches d'*A. baumannii* sont principalement isolées au niveau des services de neurochirurgie et de réanimation avec un taux de **33.33% (6souches)** et **22.22% (4souches)** respectivement.

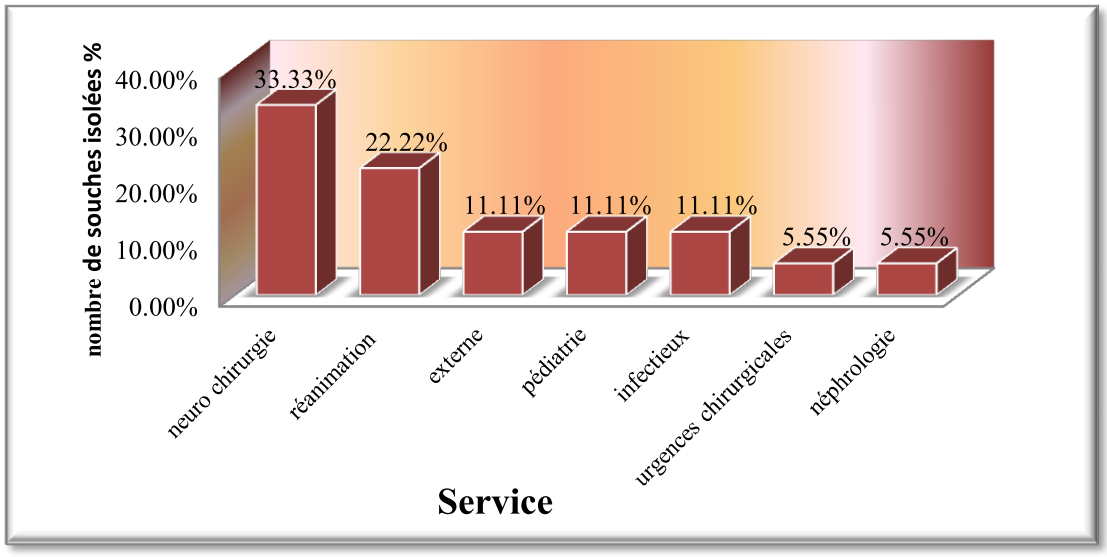
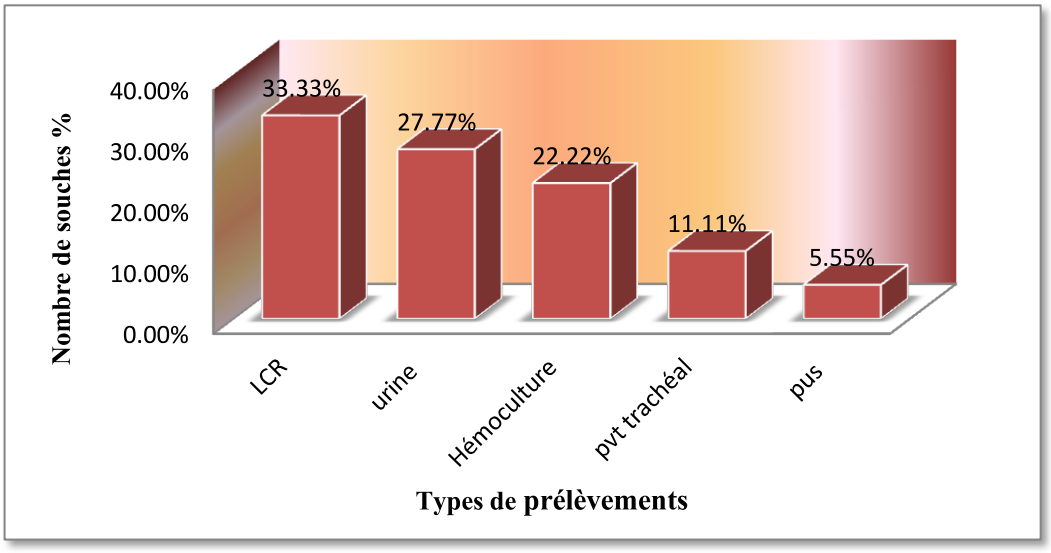


Figure 1 : Répartition des souches *d'Acinetobacter baumannii* par services

1.2. Répartition des souches par type de prélèvements

Les souches d'*A. baumannii* sont isolées à partir du LCR, urines et hémoculture avec des taux de **33,33%** (6 souches), **27.77%** (5 souches) **et 22.22%** (4 souches) respectivement.

Deux souches **(11.11%)** sont isolées des prélèvements trachéaux et une seule souche **(5.55%)** à partir du pus (Figure 2).



Pvt : prélèvement, **LCR** : Liquide Céphalo-Rachidien

Figure 2: Répartition des souches d'*Acinetobacter baumannii* par type de prélèvements.

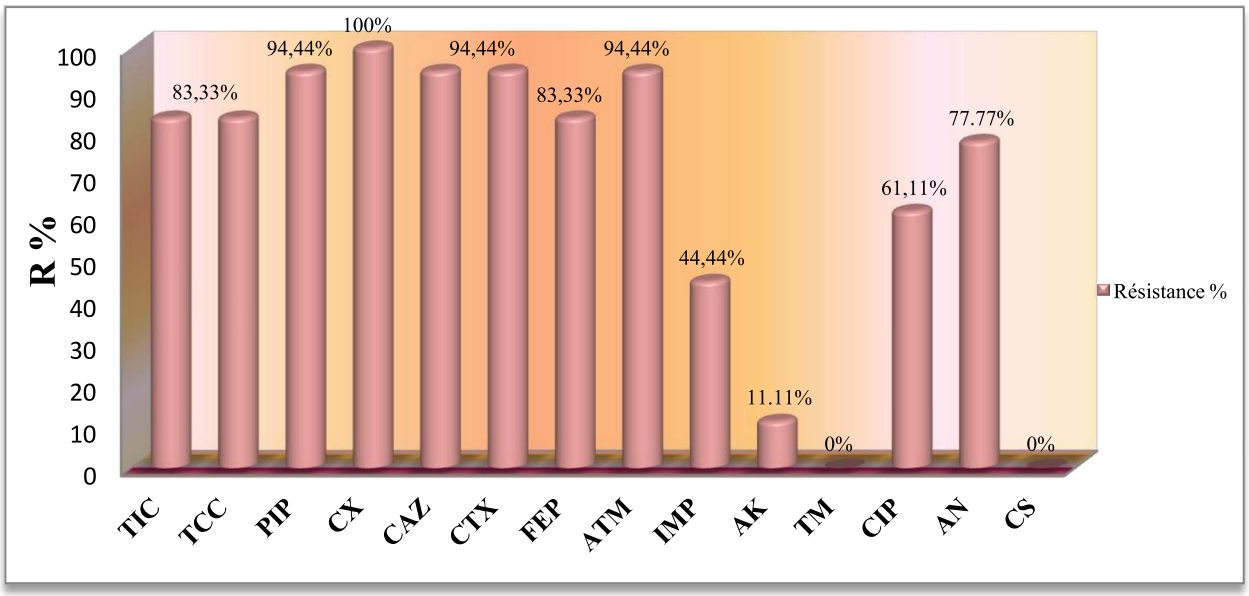
2. Résistance des souches aux antibiotiques

Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques testés, sont représentés dans le tableau N°IV.

Diamètres des zones d'inhibition (mm) ainsi que les profils de résistance des souches aux antibiotiques

HOP	TIC	TCC	PIP	CX	CAZ	CTX	FEP	ATM	IMP	AK	TOB	AN	CIP
Sétif	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	13 (R)	10 (R)	12 (I)	34 (S)	36 (S)	6 (R)	6 (R)
Sétif	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	14 (R)	6 (R)	13 (I)	34 (S)	36 (S)	6 (R)	6 (R)
Sétif	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	14 (R)	6 (R)	14 (R)	32 (S)	33 (S)	6 (R)	7 (R)
Sétif	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	14 (R)	6 (R)	15 (R)	31 (S)	32 (S)	6 (R)	6 (R)
Sétif	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	10 (R)	20 (S)	22 (S)	6 (R)	9 (R)
Sétif	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	18 (R)	6 (R)	11 (R)	17 (S)	19 (S)	6 (R)	10 (R)
Sétif	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	12 (I)	30 (S)	22 (S)	6 (R)	6 (R)
Sétif	6 (R)	6 (R)	10 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	10 (R)	6 (R)	12 (R)	30 (S)	20 (S)	6 (R)	11 (R)
Sétif	11 (R)	13 (R)	11 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	19 (I)	13 (R)	52 (S)	33 (S)	26 (S)	20 (S)	32 (S)
Sétif	6 (R)	6 (R)	13 (I)	17 (R)	6 (R)	6 (R)	19 (I)	6 (R)	36 (S)	12 (R)	29 (S)	6 (R)	18 (I)
Sétif	23 (S)	28 (S)	12 (I)	6 (R)	6 (R)	11 (R)	22 S	16 (R)	36 (S)	26 (S)	31 (S)	6 (R)	22 (S)
Sétif	9 (R)	9 (R)	10 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	20 (I)	10 (R)	29 (S)	26 (S)	29 (S)	6 (R)	19 (I)
Sétif	16 (R)	16 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	14 (R)	6 (R)	36 (S)	28 (S)	30 (S)	20 (S)	28 (S)
Sétif	10 (R)	12 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	14 (R)	6 (R)	42 (S)	30 (S)	32 (S)	22 (S)	32 (S)
Sétif	6 (R)	12 (R)	17 (I)	8 (R)	6 (R)	7 (R)	14 (R)	6 (R)	42 (S)	17 (S)	35 (S)	6 (R)	30 (S)
Sétif	6 (R)	6 (R)	11 (R)	13 (R)	6 (R)	6 (R)	19 (I)	6 (R)	42 (S)	16 (I)	27 (S)	6 (R)	10 (R)
Sétif	32 (S)	23 (S)	23 (S)	12 (R)	22 (S)	24 (S)	30 (S)	25 (S)	42 (S)	29 (S)	29 (S)	24 (S)	28 (S)
Sétif	23 (S)	20 (S)	7 (R)	6 (R)	6 (R)	7 (R)	22 (S)	16 (R)	36 (S)	32 (S)	36 (S)	6 (R)	22 (S)

Les taux de résistance des souches d'*A.baumannii* vis-à-vis des différentes classes d'antibiotiques testées sont représentés dans la figure suivante.



TCC : Ticarcilline + acide clavulanique, **TIC :** Ticarcilline**, FEP :** Cefepime, **ATM** : aztréoname **PIP :** Pipéracilline, **CX :** Céfoxitine, **CTX :** Céfotaxime, **CAZ :**Céftazidime, **IMP** : Imipénème, **AK** : Amikacine, **TM** : Tobramycine, **CIP** : Cirpofloxacine, **CS** : colistine, **AN :** Acide Nalidixique

Figure 3 : Taux de résistance des souches d'*Acinetobacter baumanii* aux différents antibiotiques testés.

D'après la figure 3, le taux de résistance de nos souches aux β-lactamines reste très élevé, avec **94.44%** pour les C3G, les ureidopénicillines et les monobatames et un taux de résistance très important aux C4G et aux carboxypénicillines **(83,33%).** L'acide clavulanique combiné avec la ticarcilline n'a aucun effet sur la résistance. On note une résistance élevée à l'imipénème **(44,44 %)**.

La résistance à la ciprofloxacine est également très élevée, avec un taux de **(61,11%)**, tandis que la résistance aux aminosides reste faible avec uniquement deux souches **(11.11%)** résistantes à l'amikacine.

Aucune des nos souches n'est résistante à la tobramycine ni à la colistine.

La figure 4, illustre les résultats de comparaison de la résistance aux antibiotiques des souches IMP-S et IMP-R.

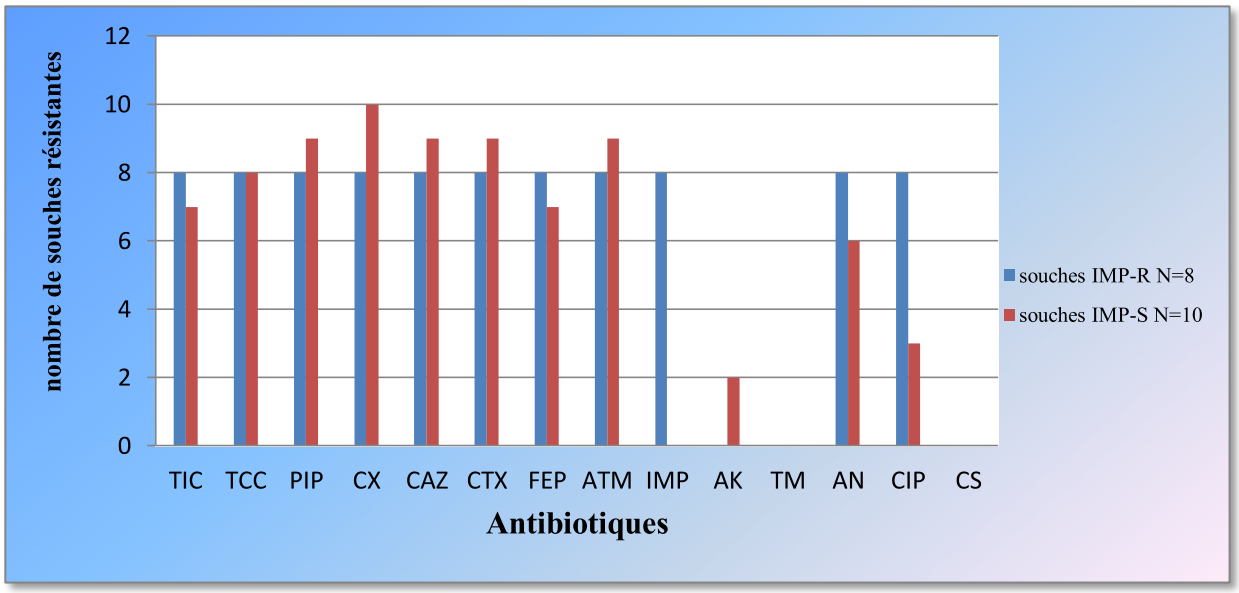


Figure 4: Comparaison entre les profils de résistance globale des souches *d'A.baumannii* imipénème-sensibles et imipénème- résistantes.

La lecture interprétative de la figure ci-dessus montre des comportements assez proches entre les souches IMP-R et IMP-S vis-à-vis des différents antibiotiques testés à l'exception de la ciprofloxacine ou on note un taux plus élevé chez les souches IMP-R. La résistance à l'Amikacine est observée uniquement chez les souches IMP-S.

3. Analyse des phénotypes de résistance

3.1. DD-test

Une image de synergie (figure 5) est observée chez 04 souches (678, 980, 705 et 99), indiquant ainsi la production probable d'une BLSE chez ces souches.

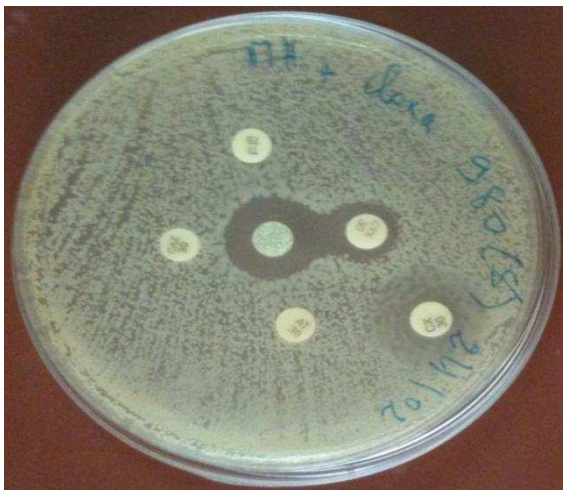


Figure 5 : image d'un DD-test positif sur gélose Muller Hinton additionnée de cloxacilline chez la souche d'*Acinetobacter baumannii* 980

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec le DD-test réalisé sur la gélose Muller Hinton additionnée de cloxacilline ont montré une récupération chez les souches 99, 413, 678, 719, 980 et 949, comparés à ceux obtenus sur Muller Hinton seul (différence d'au moins 6mm), ce qui indique un phénotype d'hyperexpression (Voir tableau N° V et figure 6).

Tableau N°V: Diamètres obtenus sur MH et MH à la cloxacilline en millimètre (mm)

Codes	CAZ	CAZ/clox	D	CTX	CTX/clox	D
393(S)	6	6	**00**	6	6	**00**
41(S)	6	6	**00**	6	6	**00**
517	6	7	**01**	6	6	**00**
451(S)	6	10	**04**	6	8	**02**
610(S)	6	6	**00**	6	6	**00**
949(S) $_b$	6	6	**00**	6	6	**00**
939(S)	6	6	**00**	6	14	**08**
662(S)	6	6	**00**	6	6	**00**
99(S)	6	6	**00**	6	17	**11**
62(S)	6	6	**00**	6	6	**00**
413(S)	6	24	**18**	11	24	**13**
644(S)	6	8	**02**	6	6	**00**
678 (S)	6	6	**00**	6	20	**14**
719 (S)	6	6	**00**	6	18	**12**
980(S)	6	6	**00**	7	11	**04**
705(S)	6	6	**00**	6	11	**05**
949(S)	6	11	**05**	7	20	**13**

D : différence de diamètre, **clox** : cloxacilline

Figure 6 : Hyperexpression de céphalosporinases chez la souche 949_a

3.2. Recherche de la production de carbapénémases

Le test de Hodge réalisé sur les 08 souches résistantes à l'imipénème (393,41, 517, 451, 610, 949_b, 939 et 662) est positif ce qui signifie qu'elles sont probablement productrices de carbapénèmases (Voir figure 7).

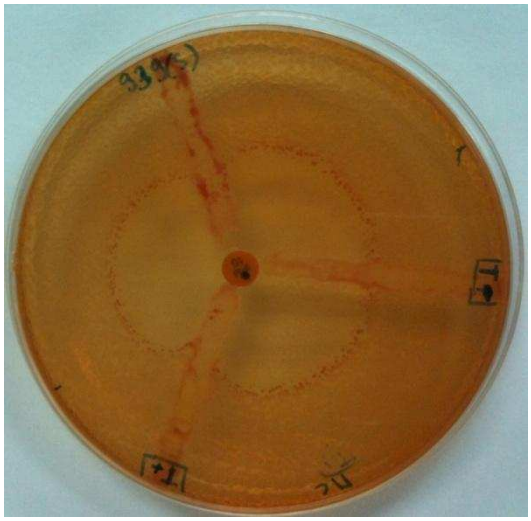


Figure7 : Test de Hodge positif sur McConkey

3.3. Recherche de métallo-β-lactamases

L'utilisation de l'EDTA a permis de détecter quatre souches productrices de MBL (610, 939, 662 et 949_b).

La figure 8 montre le résultat du test de synergie (l'imipénème – EDTA) et le test des doubles disques.

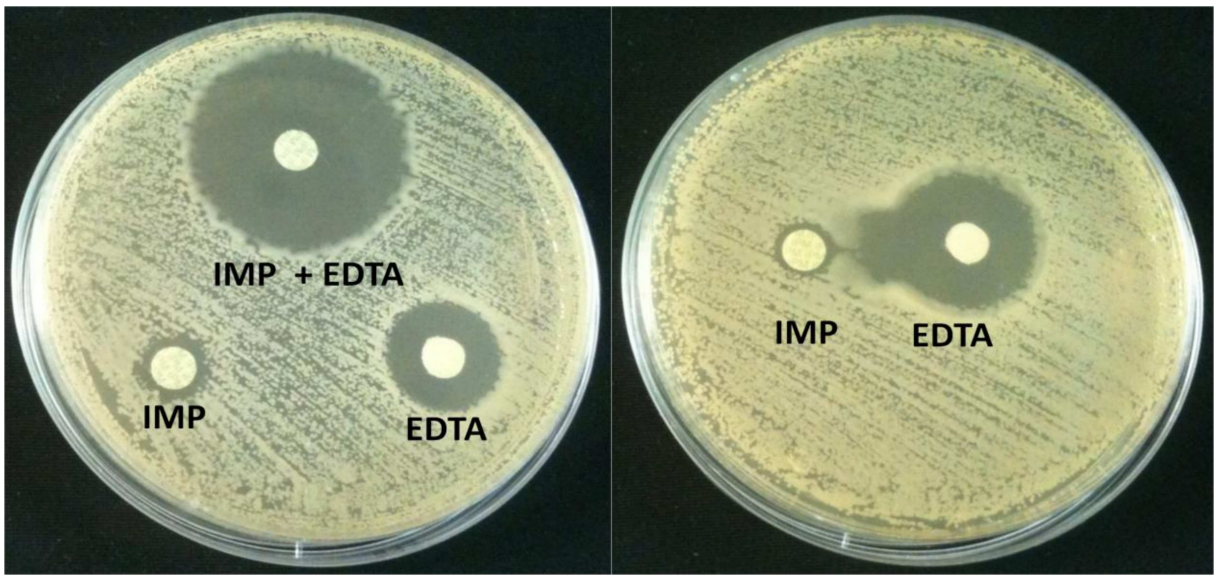


Figure 8 : Résultat du test de synergie entre l'IMP et l'EDTA pour la souche 939

4. Détermination des CMIs et recherche des oxacillinases

Nous rapportons dans le tableau N°VI, les différentes CMI obtenues pour l'Imipénème avec et sans NaCl.

Tableau N°VI: Résultats des CMIs

Souches	IMP	
	MH	**MH+NaCl (200mM)**
610	256	128
451	64	32
517	128	64
393	64	64
949 $_b$	256	128
41	64	32
662	128	64
939	128	128

D'après ce tableau, la CMI de l'imipénème sur gélose Muller Hinton seule est de 64 µg/ml pour les souches (451, 393 et 41), 128 µg/ml pour les souches (517, 662 et 939) et enfin de 256µg/ml pour les souches (610 et 949_b). L'ajout du NaCl a permis de réduire de moitié la CMI de l'imipénème chez toutes les souches testées à l'exception de deux souches (393 et 939) témoignant ainsi l'inhibition par le NaCl des oxacillinases retrouvées chez ces souches résistantes. Les CMIs des souches probablement productrices de MBL ($610/949_b/662/939$) sont élevées (128µg/ml à 256µg/ml) comparé aux CMIs des soches non MBL.

5. Déduction des phénotypes de résistance aux β-lactamines

Les résultats de l'analyse des phénotypes de résistance aux β-lactamines sont interprétés, en général, selon l'organigramme suivant (voir figure 10) puis résumés dans le tableau N°VIII :

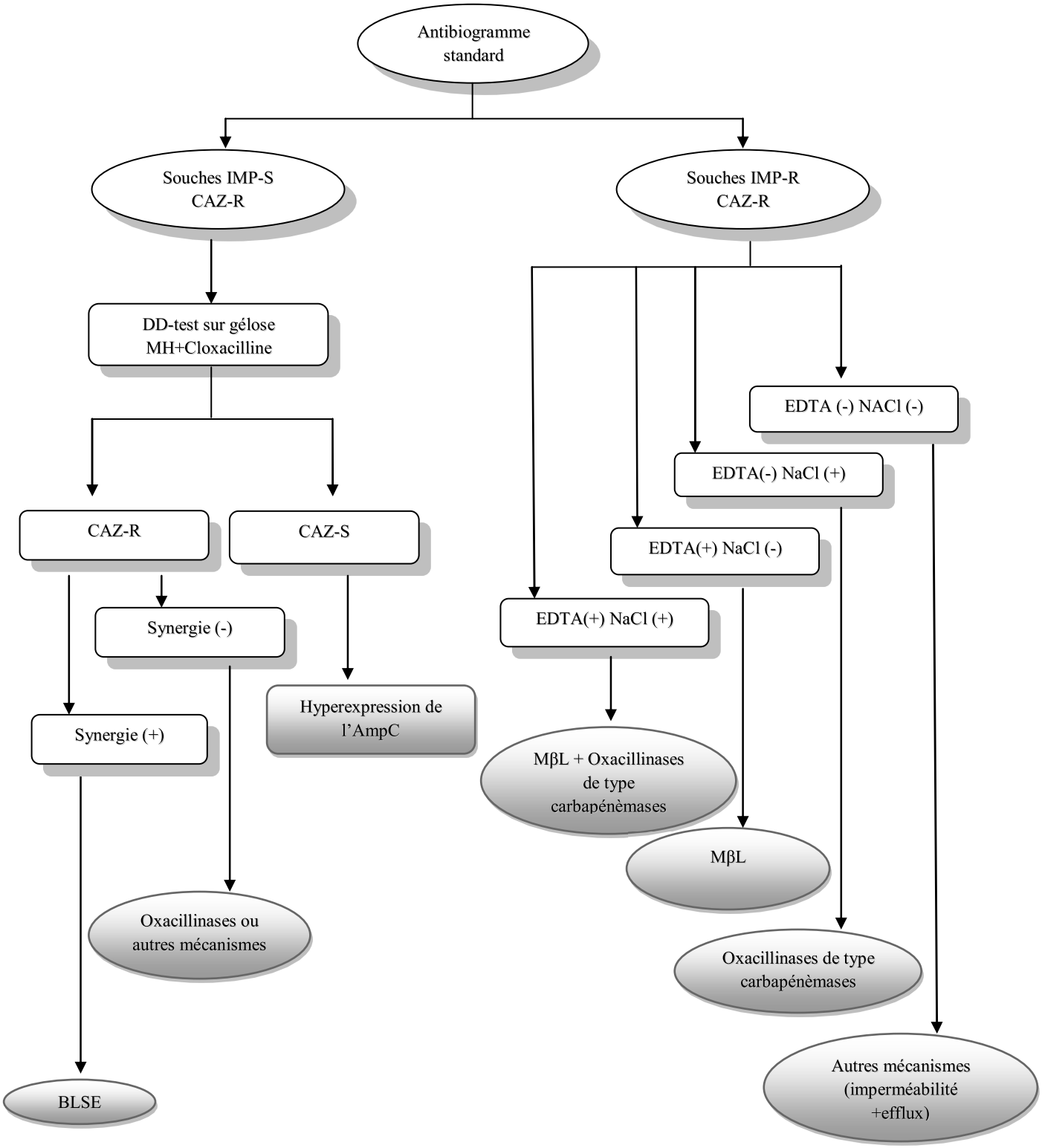


Figure 9 : Algorithme utilisé pour la déduction des phénotypes de résistance aux β-lactamines

Tableau N° VII: Résultats de l'analyse des phénotypes de résistance aux β-lactamines.

souches	DD-test MH	DD-test MH+cloxa	Test de Hodge	Test à l'EDTA	Test à l'NaCl	Phénotype de résistance probable
393	-	-	+	-	-	Autre OXA
41	-	-	+	-	+	OXA
517	-	-	+	-	+	OXA
451	-	-	+	-	+	OXA
610	-	-	+	+	+	MBL+OXA
949 b	-	-	+	+	+	MBL+OXA
939	-	-	+	+	-	MBL
662	-	-	+	+	+	MBL+OXA
99	+	+	NT	NT	NT	BLSE+HYPER
62	-	-	NT	NT	NT	Autre
413	-	+	NT	NT	NT	HYPER
644	-	-	NT	NT	NT	Autre
678	+	+	NT	NT	NT	BLSE+HYPER
719	-	+	NT	NT	NT	Autre + HYPER
980	+	+	NT	NT	NT	BLSE
705	+	+	NT	NT	NT	BLSE
967	-	-	NT	NT	NT	SENSIBLE
949	-	+	NT	NT	NT	HYPER

Cloxa : cloxacilline, **NT** : non testé, **OXA** : oxacillinases. **MBL** : Metallo-β-lactamases, **hyper** : hyperproduction, **autre** : autres mécanismes de résistances.

Il est à noter d'après le tableau ci-dessus que 04/18 (22.22%) de nos souches résistent probablement avec des BLSE dont deux d'entre elles sont associées à une hyperexpression de la céphalosporinase naturelle, et 02/18 (11.11%) résistent uniquement par hyperexpression de celle-ci. A ce qui est des souches résistantes à l'IMP, huit souches sont productrices de carbapénèmases : 04/18 (22.22%) possèdent, probablement, des MBL dont trois sont associées à des oxacillinases et 04/18(22.22%) d'entre elles renferment des oxacillinases uniquement.

Depuis quelques décennies, *A. baumannii* pose de sérieux problèmes thérapeutiques partout dans le monde. Bien que dans les années 1960, il a été considéré comme un pathogène de bas niveau ignoré lorsqu'on l'isole à partir d'échantillons cliniques. *A. baumannii* est devenu l'un des agents pathogènes les plus importants, en particulier dans les unités de soins intensifs (USI), les services de chirurgie « lourde » et les unités de grands brûlés. Nos résultats concordent avec ces données car la prédominance des souches est observée au niveau des services de neurochirurgie et de réanimation (33.33% et 22.22% respectivement). La persistance des infections nosocomiales (IN) est liée à un ensemble de facteurs, parmi lesquels figure principalement la ventilation assistée, l'antibiothérapie à large spectre, la durée de séjour prolongée, le cathétérisme artériel, la sévérité de la pathologie sous-jacente et l'immunodépression (Joly-Guillou et *al*., 2006).

Dans notre étude, les souches d'*A. baumannii* ont été isolées à partir de différents prélèvements à savoir le LCR, les urines, l'hémoculture, prélèvements trachéaux ainsi que les pus. La fréquence la plus élevée est retrouvée au niveau du LCR (33.33%). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par McConnell et *al*., en 2013 indiquant l'implication croissante des souches d'*A. baumannii* dans les méningites, survenues chez les patients après interventions neurochirurgicales (McConnell et *al*., 2013). Le traitement des souches d'*A. baumannii* multirésistantes retrouvées au niveau du LCR pose un véritable problème thérapeutique due au nombre limité de molécules actives, ayant la propriété de franchir la barrière hémato-méningée et la diffusion dans le LCR. L'isolement des souches d'*A. baumannii* à partir des urines (27.77%), vient en deuxième position après les prélèvements du LCR, ceci peut être lié aux actes invasifs (pose de sonde, cathéters par formation de biofilm ou chirurgie) ou même aux mauvaises pratiques d'hygiènes, favorisant les infections nosocomiales en général (O'Shea et *al*., 2012). Les bactériémies nosocomiales dues à *A. baumannii* sont observées dans 22.22% des cas. Ce taux est nettement plus élevé que celui de 3% rapporté par Giamarellou et *al*. (Giamarellou et *al*., 2008). Les sources les plus courantes de ces bactériémies dues à *A. baumannii* sont les infections des voies respiratoires inférieures, les dispositifs intravasculaires, les infections des plaies et des voies urinaires, ainsi que les patients immunodéprimés, et l'échec de l'antibiothérapie antérieure. (McConnell et *al*., 2013). En ce qui concerne les prélèvements bronchiques, Appleman et *al.*, 2000, ont rapporté que les souches d'*A. baumannii* isolées à partir des prélèvements bronchiques au niveau du service de réanimation représentent 5% à 10% des cas de pneumonies nosocomiales dans ce service, en particulier chez les patients atteints de pneumonie sous ventilation assistée (Appleman et *al.*, 2000). Ces pourcentages sont similaires avec nos résultats ou 11.11% des souches sont isolées

de prélèvements trachéaux. Les infections broncho-pulmonaires à *A. baumannii* peuvent être dues à l'implication de la ventilation artificielle (Appleman et *al.*, 2000 ; Kempf et *al.*, 2012). La comparaison de nos résultats avec ceux d'autres études rapportées dans la littérature est un peu difficiles car les chiffres sont variables d'une étude à l'autre et dépendent étroitement de la proportion de lits ainsi que de la période d'isolement des souches.

L'une des principales raisons de l'intérêt porté à la souche d'*A. baumannii* est sa remarquable capacité à acquérir et à accumuler les déterminants de la résistance aux antibiotiques conduisant à l'émergence de souches multirésistantes (MDR). Cette multirésistance a été décrite pour la première fois à Taiwan en 1998 et depuis, son incidence ne cesse de croître dans plusieurs pays et au fil du temps (Chbani et *al.,* 2004). Cela est montré par la recherche bibliographique réalisée par Kempf et Rolain, qui rapportent uniquement 139 citations pour *A. baumannii* de l'année 1980 à 1999 alors que plus de 2000 citations ont été signalées de 1999 à la fin de l'année 2010 pour cette même souche. La hausse des citations a été clairement corrélée avec le problème de la résistance aux antibiotiques, qui représente plus de 65% de toutes les citations d'*A. baumannii* de 2005 à 2010 (Figure 11) (Kempf et Rolain., 2012)

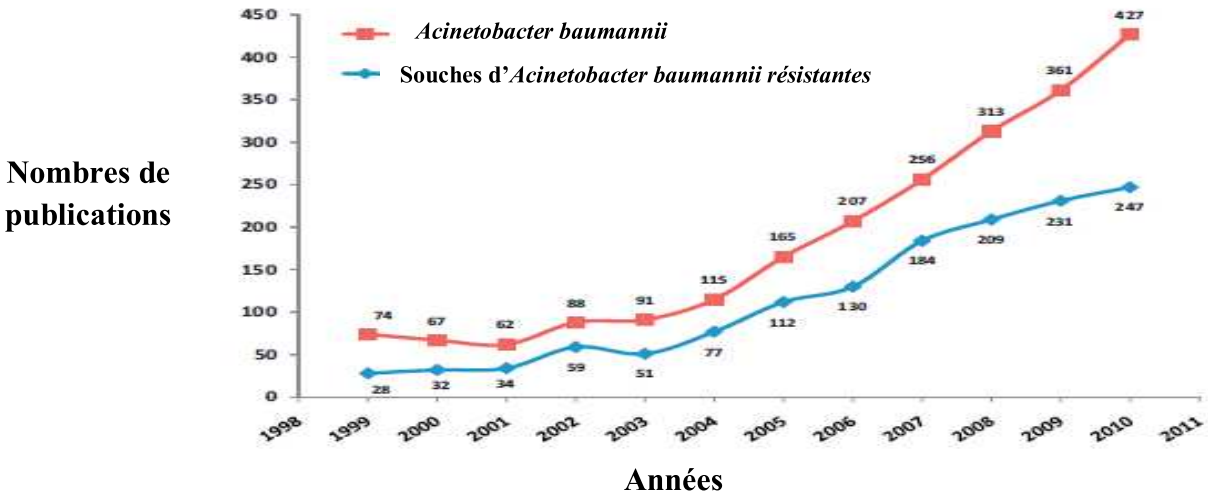


Figure 10 : Nombre de publications trouvées dans PubMed de 1999 à la fin de 2010 montrant la corrélation entre l'augmentation des citations des souches *d'Acinetobacter baumannii* en rapport avec la résistance aux antibiotiques (Kempf et Rolain, 2012).

Nos résultats confirment la notion de cette multirésistance chez les souches d'*A. baumannii* retrouvées résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques, à savoir les β-lactamines à large spectre, les aminosides et les fluoroquinolones. Plusieurs études ont montré que la résistance aux β-lactamines est de plus en plus fréquente. (Tableau N°IX)

Tableau N°VIII : Taux de résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux différents antibiotiques testés comparés à quelques études sélectionnées.

	TIC	TCC	PIP	TZP	CAZ	FEP	CTX	ATM	IPM	AK	TM	CIP	référence
R %	**83.33**	**88.88**	**94.44**	**NT**	**94.44**	**83.33**	**94.44**	**94.44**	**44.44**	**17.39**	**0**	**61.11**	**Nos résultats (2011-2013)**
R %	**NT**	**74.0**	**78.6**	**70.4**	**65.4**	**66.0**	**76.7**	**NT**	**41.9**	**59.1**	**NT**	**59.7**	Jiancheng et *al.*, 2013 (chine)
R %	51.7	36.8	58.4	32.2	55.2	51	NT	NT	31	35.9	64.9	64.3	Ben Haj Khalifa et Khedher 2010 (Tunisie)
R %	79	NT	85	NT	85	71	NT	74	43	88	95	69	Lim et *al.*, 2007 (Corée)
R %	NT	NT	NT	NT	50.3	NT	91	NT	42.6	35.8	53.6	65.8	Lahsoune et *al.*, 2007 (Maroc)
R %	NT	NT	17	13.2	18.9	15.1	26.4	64.2	17	20.8	22.6	17	Jeong et *al.*, 2006 (Corée)
R %	100	100	NT	50	100	NT	NT	NT	65.4	92.4	46	100	Katragkou et *al.*, 2006 (Grèce)
R %	76	NT	92	NT	74	NT	78	60	29	19	97	73	Joshi et *al.*, 2003 (Inde)
R %	72.3	44.9	78.7	52.7	63.3	60	NT	NT	23.8	41	70.8	68	Elouennass et *al.*,2003 (Maroc)

ATB : antibiotique, NT : non testé

Ainsi, l'*A. baumannii* est une espèce qui dispose d'un arsenal enzymatique extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action antibiotique (Mansour et *al.*, 2008). D'après l'analyse des profils de résistance aux β-lactamines, nos souches se répartissent en deux phénotypes majeurs : des souches résistantes aux Céphalosporinases à Large Spectre-imipénème sensibles, et des souches résistantes aux Céphalosporinases à Large Spectre-imipénème résistantes.

Pour le premier phénotype, nous avons noté un taux de résistance élevé aux C3G et C4G (>80%) chez ces souches ce qui peut être expliqué, probablement, par l'hyperexpression de la céphalosporinase naturelle, acquisition d'une BLSE, imperméabilité et mécanisme d'efflux.

Contrairement à ce qui est observé chez les entérobactéries, la description de BLSE chez *A.baumannii* reste relativement rare (Poirel et Nordmann, 2008 et Peleg et *al*., 2008). En effet, nos résultats vont dans cette même conclusion. Seulement 22.22% de nos souches sont probablement productrices de BLSE. Ces dernières seraient probablement associées à une hyperexpression de l'AmpC naturelle (Poirel et *al*., 2008).

La BLSE la plus répandue chez *A. baumannii* est de type PER-1. En 1996, des souches productrices de PER-1 étaient identifiées dans 11% des isolats résistants à la céftazidime en Turquie (Vahaboglü et *al.*, 1997) puis dans 31% des isolats ayant la même résistance en 2003 dans ce même pays (Kolayli et *al.*, 2005). Cette même BLSE est très répandue en Corée du sud, identifiée dans 54% des isolats d'*A. baumannii* (Yong et *al.*, 2003). La deuxième BLSE la plus importante chez *A. baumannii* est VEB-1, largement identifiée dans des épidémies dues à *A. baumannii* dans les hôpitaux Français (Naas et *al*., 2006). Dans notre étude, le type de BLSE suspecté ne peut être déterminé sans avoir recours à l'identification moléculaire du gène par PCR et séquençage.

La plupart des isolats d'*A. baumannii* étaient sensibles aux carbapénèmes jusqu'au début des années 1990 mais depuis, la résistance d'*A. baumannii* à ces composés a augmenté de manière alarmante surtout ces dernières décennies. Cependant, la résistance à l'imipénème est variable selon les auteurs, allant de 3,1 à 60 % (Chbani et *al.*, 2004 ; Ling et *al.*, 2005 ; Picazo et *al.*, 2006). Notre étude objective une résistance élevée à l'imipénème (44.44%). Cette résistance à l'imipénème, due probablement à la production de carbapénémases de type oxacillinases, ou MβL, voir même des enzymes de classe A (KPC ou GES), a été révélée par le test Hodge, l'inhibition par l'EDTA et par le NaCl.

Les oxacillinases sont habituellement inhibées *in vitro* par le NaCl, mais leur activité n'est que très peu inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Cependant, le NaCl ne réduit pas les CMI des carbapénèmes de plus d'une fois, ainsi les CMI de l'imipénème restant dans la catégorie de résistance (pas de diminution de moins de 32µg/ml) pour nos souches suggère la combinaison de plusieurs oxacillinases de types carbapénèmases ainsi que d'autres mécanismes de résistance chez ces isolats comme l'imperméabilité ou l'efflux (Pournaras et *al*., 2006).

En Algérie, la diffusion de l'OXA-23 chez les isolats d'*A. baumannii* a été signalée depuis 2010. La co-production du gène bla_{OXA-23} avec d'autres gènes oxacillinases a été rapportée : bla_{OXA-24} (Mesli et *al*., 2013), bla_{OXA-72} (Bakour et *al*., 2012) et bla_{OXA-58} (Touati et *al*., 2012). Cela peut suggérer que l'épidémiologie probable de la résistance aux carbapénèmes

par oxacillinases chez les souches d'*A. baumannii* a changé en Algérie, avec le gène bla_{OXA-23}, codant les carbapénèmases, étant le plus répandu dans notre pays (cinq articles ont été publiés depuis 2010). La fréquence d'isolement des gènes bla_{OXA-23} en Algérie et la co-existence de ces différentes oxacillinases de types carbapénèmases au sein de la même souche, augmente la possibilité de transmission des gènes codants ces enzymes à nos souches isolées dans ce même pays, et qui est aussi, probablement, à l'origine des taux élevés de co-résistance à la plupart des autres classes d'antibiotiques testés.

La présence de l'OXA-51 naturelle uniquement chez *A.baumannii* a été suggérée pour expliquer la résistance aux carbapénèmes et l'élévation des CMI de l'imipénème à 128µg/ml (Zarrilli et *al*., 2013). C'est ainsi que les CMI de 128µg/ml retrouvée pour certaines de nos souches peuvent être due uniquement la surexpression de cette oxacillinases naturelle.

Le taux de résistance à l'IMP chez nos souches dû à la production probable de MBL (22.22%) est situé dans l'intervalle des taux de résistances rapportés en Turquie (33.3%), en Amérique latine (32%), en Corée (14,2%) et au Maroc (38%) (Ait el Kadi et *al.* 2006). Nos résultats (4 souches MBL) peuvent être similaires avec les résultats de Mesli et al. en 2013, rapportant, chez cinq souches d'*A. baumannii* isolées à partir des patients hospitalisés au niveau des unités de soins intensifs de l'hôpital d'Oran en Algérie, des MBL de type NDM-1 (Mesli et *al*., 2013). Les isolats produisant des MβL de type SIM-1 exhibent des CMI à l'imipénème entre 8 et 16 mg /L (Lee et *al.,* 2011) alors que les CMI retrouvées avec nos souches sont supérieures (128 et 256 mg/l). Ainsi, les MβL identifiées chez nos souches sont probablement de type IMP, VIM ou NDM-1. Ces trois dernières peuvent être à médiation plasmidique ou chromosomique, et leur disposition dans les plasmides leur confère une large diffusion dans des régions spécifiques comme par exemple l'Italie et la Corée (Poirel et Nordmann, 2008).

Enfin, seuls les outils de biologie moléculaires peuvent déterminer exactement le type d'oxacillinases ou de MBL exprimées par nos souches résistantes à l'Imipénème.

La résistance d'*A. baumannii* aux aminosides a connu depuis 1980, une évolution très brutale (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010). La résistance acquise à cette famille d'antibiotiques est variable selon les pays comme illustré dans le tableau N°IX. On rapporte un taux de résistance de 17.39% inscrit pour l'amikacine et aucune résistance n'a été observée pour la Tobramycine.

Cette résistance aux aminosides se manifeste par plusieurs mécanismes, cependant le mécanisme de résistance le plus fréquent est la production d'enzymes modificatrices telle que

la phosphotransférase APH (3')-VI codée par le géne *aph(3')-VI* qui donne une résistance à l'amikacine et une sensibilité à la tobramycine (Lambert, 2006 ; Courvalin et *al.*, 2006).

D'après le tableau N°IX, on observe que les taux de résistance à la ciprofloxacine est variable d'un pays à un autre, nous rapportons un taux élevé de 61.11%. D'après Lecaillon et *al.* en 2004, les souches résistantes à la ciprofloxacine sont également résistantes aux autres fluoroquinolones. En effet, nos résultats vont dans cette même conclusion ou nous avons retrouvé que les souches résistantes à la ciprofloxacine présentent un même taux de résistance pour l'Acide nalidixique. La résistance aux fluoroquinolones peut être due à des mutations de la cible (gyrA et parC) ± l'imperméabilité membranaire (Courvalin et *al.*, 2006) avec une forte probabilité de la contribution du système d'efflux AbeM qui est une pompe multirésistante (Lecaillon et *al.,* 2004).

La sensibilité à la colistine de nos souches peut être expliquée par le fait que cette molécule antibiotique n'est pas encore utilisée pour le traitement des infections à *A. baumannii* en Algérie, d'ailleurs elle est un peu délaissée en raison de sa néphrotoxicité et réservée juste pour le traitement des épidémies à *Salmonella Typhi* (Bouzenoune et *al.*, 2010). Cependant, des isolats cliniques résistants à la colistine ont déjà été rapportés dans d'autre pays du monde. L'apparition de plus en plus de résistances hétérogènes pour cette classe d'antibiotiques est due à l'augmentation de l'usage de cette molécule en monothérapie pour le traitement des infections causées par les souches multirésistantes d'*A. baumannii* (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010 et Al-Sweih et *al*., 2012).

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

La présente étude nous permit de collecter 18 souches d'*Acinetobacter baumannii* à partir du CHU de Sétif. La majorité des souches ont été retrouvées dans le service de neurochirurgie (33.33%) et de réanimation (22.22%). Le LCR était le site principal d'isolement des souches avec un taux de 33.33% suivi des prélèvements à partir des urines, hémocultures, prélèvements trachéaux et pus.

Les souches d'*A.baumannii* receuillies objective une résistantes élevé a toutes les β-lactamines et aux fluoroquinolones testés, mais sont moins résistantes aux aminosides, nous avons rapporté un faible taux de résistance à l'amikacine (11.11%). Nos souches sont toutes sensibles à la tobramycine et à la colistine.

Ainsi, la résistance aux antibiotiques décrite chez les souches étudiées pourrait être liée d'une part à l'hyperexpression de l'AmpC naturelle et de l'oxacillinase (OXA-69) due à la présence de la séquence d'insertion IS*Aba1*, production de BLSE, production de carbapénèmases de type MβL, et oxacillinase. D'autre part, des mécanismes non enzymatiques, incluant l'efflux et l'imperméabilité naturelle peuvent être incriminée.

En 2010, l'épidémiologie de résistance à l'imipénème, en Algérie était principalement due à l'acquisition d'oxacillinases de type OXA-23, cependant, ces deux dernières années, nous avons marqué une explosion dans la caractérisation des MBL de type NDM-1 dans notre pays comme le montre les travaux de Boulanger et al., en 2012 et Mesli et al., en 2013. 50% de nos souches résistante à l'imipénème sont probablement productrice de ces carbapénèmases.

Enfin, cette étude rapporte, l'importance actuelle de souches d'*Acinetobacter baumannii* multirésistantes qui tient à la capacité de dissémination de cette bactérie et son aptitude à développer des infections nosocomiales sévères et la multirésistance alarmante s'avère être le fruit d'une association de mécanismes enzymatiques (naturels et acquis) et non enzymatiques.

Le traitement actuel des infections à *Acinetobacter baumannii* est sujet de controverses, en effet la liste des antibiotiques actifs devient de plus en plus restreinte et l'efficacité de l'imipénème est remise en cause vu l'émergence de souches de plus en plus résistantes.

En perspective,

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

- Les techniques de biologie moléculaire qui confirmeront les phénotypes de résistance probables.

- L'identification et la caractérisation de l'environnement génétiques (séquences d'insertions, les intégrons, les transposons…)
- Etude des supports génétiques (plasmidiques ou chromosomiques) responsables d'une éventuelle dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif
- Suivit, dans le temps, de l'évolution des mécanismes de résistances

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

A

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

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

Amudhan MS, Sekar U, Kamalanathan A et Balaraman S. (2012). bla_{IMP} and bla_{VIM} mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. JIDC. 11, 757-762.

Appleman MD, Belzberg H, Citron DM, Heseltine PN, Yellin AE, Murray J et Berne TV. (2000). In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. Antimicrob Agents Ch. 44, 1035-1040.

B

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

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

Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissoir B, Nordmann P et Glupczynski Y. (2010). GES extended-spectrum β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. Antimicrob Agents Ch. 54, 4872–4878.

Bou G, et Martinez-Beltran J. (2000). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Ch. 44, 428-32.

Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P. (2012). NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. Antimicrob Agents Ch. 56, 2214-2215.

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

British Society For Antimicribial Chemotherapy: Methods for antimicrobial susceptibility testing. (Version Janvier 2006).

Brown S, Young HK, et Amyes SGB. (2005). Characterization of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infec.11: 15-23.

C

Chbani F, Zoughaghi L, Taouragt K, Aarab H, et Benaouda A. (2004). *Acinetobacter baumanii* : épidémiologie et résistance aux antibiotiques. Prat .14, 23–4.

Comite De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie. Norme n°2 : Méthode de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. (Version 2, 1995).

Comite De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie : Recommandations 2010. (Edition de Janvier 2010).

Courvalin P, Leclercq R, et Bingen E. (2006). Antibiogramme. Ed. ESKA, Paris : 396-398

D

Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E et Quentin R. (2007). Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed. Masson. 344-345.

Doughari HJ, Ndakidemi PA, human IS et Benade S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter spp*.: An Overview. Microb Environ. 2, 111.

Drissi M, Poirel L, Mugnier PD, Baba Ahmed Z et Nordmann P. (2010). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. Eur J Clin Microbiol. 29, 1457–1458.

E

Elouennass M, Bajou T, Lemnouer AH, Foissaud V, Hervé V et Baaj AJ. (2003). *Acinetobacter baumannii*: étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, Maroc. Med Maladies Infect. 7, 361-364.

Euzeby JP (2010). Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse . Le texte original est librement disponible sur : <http://www.bacteriologie.net/generale/resistancenaturelle.html> (consulté le 15.05.2013).

F

Fournier PE et Richet H. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis. 42, 692–699.

G

Giamarellou H, Antoniadou A et Kanellakopoulou K. (2008). *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? International Journal of Antimicrobial Agents. 32, 106–119.

Godineau-Gautheyi N, Lesage D, Tessier F, Kollia D, et Daguet GL. (1988). *Acinetobacter calcoaceticus* variété *Antitratus* ou *Acinetobacter baumannii*. Etude de la sensibilité aux antibiotiques de 65 souches hospitalières. Médecine et Maladies Infectieuses. 2, 124-129.

Gordon NC et Wareham DW. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Ag. 35, 219–226.

H

He C, Xie Y, Zhang L, Kang M, Tao C, Chen Z, Lu X, Guo L, Xiao Y, Duo L et Fan H. (2011). Increasing imipenem resistance and dissemination of the ISAba1-associatedblaOXA-23gene among *Acinetobacter baumannii* isolates in an intensive care unit. J Med Microbiol. 60, 337–341.

Héritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D et Nordmann P. (2005). Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Ch. 49, 4174–4179.

Hodge W, Ciak J et Tramont EC. (1978). Simple method for detection of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol. 7, 102–103.

J

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

Jeong SH, Bae IK , Park KO, An YJ, Sohn SG , Jang SJ , Sung KH , Yang KS , Lee K, Young D et Lee SH. (2006). Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea. J Microbiol. 44 (4):423-431

Jiancheng X, Zhihui S, Yanyan L, Zhou Q. (2013). Surveillance and Correlation of Antibiotic Consumption and Resistance of *Acinetobacter baumannii* complex in a Tertiary Care Hospital in Northeast China, 2003–2011. Int J Environ Heal R. 10, 1462-1473.

Joly-Guillou ML et Bergogne-Bérézin E. (2006). Les bactéries du genre Acinetobacter revisitées : Leur importance actuelle. Antibiotiques. 8:94-99

Joshi SG, Litake GM, Niphadkar KB et Ghole VS. (2003). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital. J Infect Chemother. 9:187–190.

K

Katragkou A, Kotsiou MM, Antachopoulos C, Benos A, Sofianou D, Tamiolaki M et Roilides E. (2006). Acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a pediatric intensive care unit: a case-control study. Intens Care Med. 32, 1384–1391.

Kempf M et Rolain JM. (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Ag. 39,105– 114.

L

Lahsoune M, Boutayeb H , Zerouali K , Belabbes H , et El Mdaghri N. (2007). Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain. Med Maladies Infect. 37, 828–831.

Lambert T. (2006). Aminosides et bactéries à Gram négatif. *In:* Courvalin P, Leclerc R, Bingen E. 2éme ed Antibiogramme. Paris: ESKA. 227-244.

Lecaillon E, Blosser-Middleton R, Sahm D et Jones M. (2004). Activity of nalidixic acid and fluoroquinolones on *Escherichia coli* strains isolated from non-complicated urinary infections (réseau TSN - France, 1999 - 2001). Med Maladies Infect. 34, 450-454.

Lee K, Kim CK, Yong D, Jeong SH, Yum JH, Seo YH, Docquier JD et Chong Y. (2010). Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemases producing Gram-negative bacilli. J Microbiol Meth. 83, 149–152.

Lee K, Yong D, Jeong SH et Chong Y. (2011). Multidrug-Resistant Acinetobacter spp. : Increasingly Problematic Nosocomial Pathogens. Yonsei Med Journal. 52, 879-891.

Lim YM, Shin KS et Kim J. (2007). Distinct Antimicrobial Resistance Patterns and Antimicrobial Resistance-Harboring Genes According to Genomic Species of *Acinetobacter* Isolates. J Clin Microbiol. 45, 902-905.

Ling TK, Ying CM, Lee CC et Liu ZK. (2005). Comparison of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Shanghai and Hong Kong. Med Princ Pract. 14, 338-41.

Lopes BS, Gallego L, Amyes SGB. (2013). Multi-drug resistance profiles and the genetic features of *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. J Infect Develop Ctries. 7, 323-328.

M

Mansour W, Bouallegue O, Dahmen S, Boujaafar N. (2008). Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux b-lactamines chez des souches de *Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). Pathol Biol. 56, 116–120.

McConnell MJ, Actis L et Pachon J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS. 37, 130–155.

Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. (2013). Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-b-lactamase in Acinetobacter species, Algeria. IJID. p5.

Moubarek C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lamber T. (2009). GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Ch. 53, 3579-81.

Mugnier PD, Poirel L, Naas T et Nordmann P. (2010). World wide dissemination of the bla_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis. 16, 35–40.

N

Nass T, Coignard B et Carbonne A. (2006). VEB-1 extended spectrum β-lactamse-producing in *Acinetobacter baumannii*, France. Emerg Infect Dis. 12**,** 1214-22.

Nordmann P. (2004). *Acinetobacter baumannii,* le pathogène nosocomial par excellence. Pathol Biol. 52, 301–303.

Nordmann P**.** (2010). Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. Médecine/Sciences. 26, 1-9.

O

O'Shea MK. (2012). Acinetobacter in modern warfare. Int J Antimicrob Ag. 39, 363– 375.

P

Peleg AY, Seifert H et Paterson DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol. 21, 538–582.

Picazo JJ, Betriu C, Rodriguez-Avial I, Culebras E, Gomez M, et Lopez F. (2006). Antimicrobial resistance surveillance: Vira study. Enferm Infecc Microbiol Clin . 24, 617-28.

Poirel L et Nordmann P. (2006). Résistance aux β-lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. Edition Msson, Paris. p100 -107

Poirel L, Nordmann P. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms of Resistance, Multiple β-lactamases. Acinetobacter Biology and Paghogenesis. Eds, Bergogne –Bérézin et al., Springer Science + Business Media. 129- 143.

Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ et Tsakris A. (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. J Antimicrob Agents Ch. 57, 557–561.

S

Siegrist HS. (2000). *Acinetobacter spp* : Infection nosocomiales, épidémiologie et résistance aux antibiotiques. Swiss-Noso, (Suisse).

T

Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, De Champs C. (2006) First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta lactamase among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. International Journal of Antimicrobial Agents. 27(5): 397-402.

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

Towner K. (2006). The genus *Acinetobacter*. Prokaryotes, Chapter: 3. 6, 746–758

V

Vahaboglu H, Ozturk R, Avgun G. (1997). Widespread detection of PER-1-type extended spectrum β-lactamase among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudmonas areuginosa* isolates in Tyrkey: a nationwide multi-center study. Antimicrob Agents Ch. 41, 2265-9.

Y

Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM et Chong Y. (2002). Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo β-Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 40, 3798–3801.

Yong D, Shin H et Kim S. (2003). High prevalence of PER-1 extendend-spectrum β-lactamse producing *Acinetobacter spp*. In Korea. Antimicrob Agents Ch. 47, 1749-51.

Z

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

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

ANNEXE I

Tableau N°IX : Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Acinetobacter* spp. (Selon le CA-SFM, 2010)

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
sulbactam		≤ 8	-		
Ticarcilline	75 µg	≤16	> 64	≥22	< 18
Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	≤ 16/2	> 64/2	≥ 22	< 18
Pipéracilline	75 µg	≤16	> 64	≥18	< 12
Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	≤16/4	> 64/4	≥19	< 14
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	*≥24*	*< 17*
Méropénème	10 µg	≤2	> 8	*≥22*	*< 15*
Doripénème	10 µg	*≤1*	*> 4*	*≥24*	*< 19*
Ceftazidime	30 µg	≤ 4	> 8	*≥21*	*< 19*
Céfépime	30 µg	≤4	> 8	*≥21*	*< 19*
Cefpirome	30 µg	≤4	> 8	*≥21*	*< 19*
Tobramycine	10 µg	≤4	> 4	≥16	< 16
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥17	< 15
Isépamicine	30 µg	≤8	> 16	≥17	< 15
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤4	> 4	≥16	< 16
Nétilmicine	30 µg	≤ 4	> 4	≥19	< 19
Chloramphénicol	30 µg	≤8	> 16	≥ 23	< 19
Tétracycline	30 UI	≤4	> 8	≥19	< 17
Colistine	50 µg	≤2	> 2	≥15	< 15
Péfloxacine	5 µg	≤1	> 4	≥ 22	< 16
Ofloxacine	5 µg	≤1	> 1	≥22	< 22
Ciprofloxacine	5 µg	≤1	> 1	≥22	< 22
Lévofloxacine	5 µg	≤1	> 2	≥ 20	< 17
Rifampicine	30 µg	≤4	> 16	≥19	< 14
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤4/76 ≤ 2/38	> 4/76 > 4/76	*≥13* *≥16*	*< 13* *< 13*

Remarque :

L'aztréonam n'a pas été mentionné dans ce communiqué de CA-SFM, ni dans d'autres versions de ce dernier.

Pour l'interprétation des diamètres des zones d'inhibition de cet antibiotique, il a fallut se référer au communiquée du BSAC (**BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICRIBIAL CHEMOTHERAPY : Methods for antimicrobial susceptibility testing; (Version Janvier 2006).**

Tableau X : interpretation des diamètres des zones d'inhibition pour l'aztréonam, selon le BSAC (BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICRIBIAL CHEMOTHERAPY : Methods for antimicrobial susceptibility testing; (Version Janvier 2006).

Table 6: MIC and zone breakpoints for Enterobacteriaceae (including *Salmonella* and *Shigella* spp.) and *Acinetobacter* spp.

	MIC breakpoint (mg/L)				Interpretation of zone diameters (mm)		
Antibiotic	R >	I	S ≤	Disc content (µg)	R ≤	I	S ≥
Amikacin	16	16	8	30	15	16-18	19
Amoxicillin[1]	16	16	8	10	11	12-14	15
Ampicillin[1]	16	16	8	10	11	12-14	15
Aztreonam[2]	1	-	1	30	23	-	24
Cefaclor	1	-	1	30	34	-	35
Cefamandole[3,4]	8	-	8	30	19	-	20
Cefepime	1	-	1	30	31	-	32
Cefixime	1	-	1	5	19	-	20
Cefoperazone[3]	4	-	4	30	24	-	25
Cefotaxime	1	-	1	30	29	-	30
Cefotetan[3]	4	-	4	30	23	-	24
Cefoxitin[4]	8	-	8	30	19	-	20
Cefpirome	1	-	1	20	24	-	25
Cefpodoxime[5,6]	1	-	1	10	**19**	-	**20**
Ceftazidime	2	-	2	30	27	-	28
Ceftazidime[7]	2	-	2	30	21	-	22
E. coli & *Klebsiella* spp.							
Ceftibuten	1	-	1	10	27	-	28
Ceftizoxime	1	-	1	30	29	-	30
Ceftriaxone	1	-	1	30	27	-	28
Cefuroxime (axetil)	1	-	1	30	24	-	25
Cefuroxime (parenteral)	8	-	8	30	19	-	20
Cefalothin[4]	8	-	8	30	26	-	27
Cefradine[4]	8	-	8	30	11	-	12
Chloramphenicol	8	-	8	30	20	-	21
Ciprofloxacin[8,9]	1	1	0.5	1	16	17-19	20
Co-amoxiclav[1]	16	16	8	20/10	11	12-14	15
Colistin[10]	4	-	4	25	14	-	15
Co-trimoxazole[11,12]	32	-	32	25	15	-	16
Doxycycline	1	-	1	30	28	-	29
Ertapenem	2	-	2	10	**27**	-	**28**
Gatifloxacin	1	-	1	2	19	-	20
Gemifloxacin	0.25	-	0.25	1	19	-	20
Gentamicin[13]	4	4	2	10	16	17-19	20
Imipenem[14]	4	-	4	10	22	-	23
Levofloxacin	2	2	1	1	13	14-16	17
Meropenem	4	-	4	10	22	-	23
Mezlocillin	16	-	16	75	21	-	22
Moxifloxacin	1	1	0.5	1	16	17-19	20
Ofloxacin	1	1	0.5	5	25	26-28	29
Piperacillin /Tazobactam	16	-	16	75/10	21	-	22
Piperacillin	16	-	16	75	23	-	24
Streptomycin[3]	8	-	8	10	12	-	13
Sulfamethoxazole	32	-	32	100	13	-	14
Timentin	16	-	16	85	20	-	21
Tobramycin[13]	4	4	2	10	17	18-20	21
Trimethoprim	2	1-2	0.5	2.5	14	15-19	20

Annexe II

- **Préparation du tampon phosphate à 0.01 M, pH 7.2 (pKa =7.2)**

pH = pKa + log $[A^-]$ /[HA] ➔log $[A^-]$ /[HA]= 0➔ $[A^-]$ /[HA]= 10 et $[A^-]$+[HA] = 0.01

➔ 10[HA]= $[A^-]$ ➔11 [HA]=0.01 ➔ [HA]=$9.1*10^{-4}$ M ; $[A^-]$= $9.09*10^{-3}$.

Dont $[A^-]$= [$Na_2HPO_412H_20$] (MM=358.13g /mol) et [HA]= [$NaH_2PO_42H_2O$] (MM=156.01g/ml).

C=n/V ➔ CV=n et n=m/M ➔ CV=m/M➔ m=CVM

➔ m $Na_2HPO_412H_20$ = $9.09*10^{-3}*100ml*10^{-3}*$ 358.13.

➔m $Na_2HPO_412H_20$ = 0.324 g.

➔m $NaH_2PO_42H_2O$=$9.1*10^{-4}*100ml*10^{-3}*$156.01.

➔m $NaH_2PO_42H_2O$=0.014 g.

La solution de tampon phosphate à 0.01 M (mol/l), pH 7.2 est préparée par dissolution de 0.324 g de $Na_2HPO_412H_2$ et 0.014 g de $NaH_2PO_42H_2O$ dans 100 ml d'eau distillée, puis ajustée au pH 7.4 stérilisée par autoclavage pendant 20 mn à 120°C.