



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Fatma Zahra SOUFI et Haizia HAFAYED

Le : mercredi 10 juillet 2019

Le profil phénotypique de la résistance aux bêta-lactamines de *Klebsiella pneumoniae* uropathogène isolée à l'hôpital El-Hakim Saâdan de Biskra

Jury :

Mme. Chahrazed Warda HALIMI	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Widad BOUGUENOUN	MCB	Université de Biskra	Rapportrice
Mme. Fadjeria YAKOUB	MAA	Université de Biskra	Examinatrice

Année universitaire : 2018/2019

Remerciement

Merci à
Dieu

*Le tout puissant qui nous a dotées de volonté
&
De patience pour ce travail*

*Nous remercions madame **Widad BOUGUENOUN** d'avoir accepté de
diriger ce travail*

*Nos remerciements vont également à **Chahrazed Warda HALIMI**
d'accepté de présider le jury.*

*Et **Fadjeria YAKOUB** de nous avoir fait l'honneur d'examiner le
travail.*

*Nous remercions aussi le chef de service de l'hôpital EL-Hakim Saâdan
le **Dr. KHLIL** et tous les personnels du laboratoire pédagogique.*

*En fin nous tenant à exprimer notre profonde sympathie à tous ceux qui
ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de nos études et
tout particulièrement l'équipe de la bibliothèque : **Fatma zahra, Soad,
Walid, Lotfi, Mohammed** et l'instituteur **Omar**.*



Dédicace

A mes très chers parents

*Pour leurs soutiens constants, leurs amours et leurs mots
d'encouragement qui m'ont permis de me rendre ici aujourd'hui
En ce jour votre fille espérée réaliser l'un de vos plus grands rêves et
couronner vos années de sacrifice et d'espoir. Que ce travail puisse être
le résultat de vos efforts et de vos sacrifices.*

*Que Dieu tout vos puissants garde et vos procures santé, bonheur et
longue vie.*

A mes chers frères

*Vous m'avez toujours manifesté une grande affection et un grand
respect, à mon tour de vous exprimer mon grand estime à travers ce
travail*

A tous mes amis (es) et ma famille

Fatma



Dédicace

*D'un sentiment plein d'amour, de sincérité et fidélité, je dédie ce travail
à mes très chers parents **Amar** et **Louiza***

*Chaque ligne de ce travail chaque mot et chaque lettre vous exprime la
reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.*

*En hommage à tous les sacrifices que vous avez consentis pour moi
durant mes longues années d'études. Je vous remercie d'avoir fait de moi
ce que je suis maintenant et de m'avoir appris à vivre dans l'honneur et
dans la dignité.*

*Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer réellement votre juste
valeur, mon profond amour que je vous porte, mon respect et ma vive
gratitude.*

*Votre confiance et votre encouragement m'ont toujours donné de la force
pour persévérer et continuer toujours vers l'avant.*

Haizia



Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des tableaux.....	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction	1
Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les infections urinaires	3
1. Définition.....	3
2. Type des infections urinaires	3
2.1. Infection urinaire simple	3
2.2. Infection urinaire à risque de complication	3
2.3. Infection urinaire récidivante	3
2.4. Infection urinaire grave.....	3
3. Les facteurs de risques des infections urinaires.....	3
3.1. Facteurs liés à l'hôte	3
3.1.1. Facteurs urologiques	3
3.1.2. Facteurs selon le terrain.....	3
3.2. Facteurs liés à l'agent pathogène	3
4. Mode de contamination	3
II. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
1. Taxonomie	4
2. Habitat	4
3. Les caractères morphologiques	4
4. Les caractères cultureux	4
5. Les caractères biochimiques	5
6. Pouvoir pathogène	5
6.1. Capsule.....	5
6.2. Lipopolysaccharide (LPS)	5
6.3. Fimbriae (adhésine).....	5
6.4. Sidérophore	6
III. Les β -lactamines et <i>K. pneumoniae</i>	6
1. Définition des β -lactamines.....	6
2. Les sous-familles des β -lactamines	6

3. Mode d'action des β -lactamines	7
4. Les mécanismes de résistance de <i>K. pneumoniae</i>	8
4.1. Résistance naturelle	8
4.2. Résistance acquise	8
4.2.1. Résistance non enzymatique	8
4.2.1.1. Modification de la cible	8
4.2.1.2. Imperméabilité.....	8
4.2.1.3. Pompe à efflux.....	9
4.2.2. Résistance enzymatique	9
4.2.2.1. Les β -lactamases de classe A « les pénicillinases »	9
4.2.2.2. Les β -lactamases de classe B « les métallob β -lactamases»	9
4.2.2.3. Les β -lactamases de classe C « les céphalosporinases»	9
4.2.2.4. Les β -lactamases de classe D «les oxacillinase»	10

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Lieu d'étude.....	11
2. Echantillonnage.....	11
3. Isolement et purification.....	11
4. Identification	11
4.1. Etude macroscopique.....	11
4.2. Etude microscopique "Etat frais et coloration de Gram".....	11
4.3. Tests d'orientation et d'identification biochimique (galerie classique)	12
5. L'étude de la sensibilité aux β -lactamines	14
5.1. Antibiogramme	14
5.2. Analyses phénotypiques des mécanismes de résistance.....	15
5.2.1. La recherche phénotypique de β -lactamines à spectre étendu (BLSE)	15
5.2.1.1. Test de synergie.....	15
5.2.1.2. Test du double disque (test espagnol)	16
5.2.2. La recherche phénotypique de carbapénèmases	17
5.2.2.1. Le test de Hodge modifié	17
5.2.2.2. Test à l'EDTA (M β L-E.test)	18
5.2.2.3. Le Carba NP test modifié (MCNPT).....	19

Chapitre 3 : RESULTATS

1. Isolement des souches	22
2. Identification des isolats.....	22
2.1. Observation macroscopique	22
2.2. Observation microscopique	22

2.3. Identification par les testes d'orientation et la galerie classique	23
3. La collecte des souches	24
4. Répartition des souches étudiées	25
4.1. La répartition des <i>K. pneumoniae</i> uropathogène en fonction des mois de prélèvement	25
4.2. La répartition des isolats en fonction d'hospitalisation	26
4.3. La répartition des isolats en fonction de l'âge	26
4.4. La répartition des isolats en fonction du sexe.....	27
5. L'étude de la résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux β -lactamines.....	27
6. Analyses phénotypiques des mécanismes de résistance	28
6.1. Recherche phénotypique des β -lactamases à spectre étendu.....	28
6.1.1. Test de synergie	29
6.1.2. Test de double disque.....	29
6.2. La recherche phénotypique des carbapénèmases	29
6.2.1. Test de Hodge modifié (MHT)	30
6.2.2. Recherche de métallo- β -lactamases	30
6.2.3. Carba-NP test modifié.....	31
7. Répartition de <i>K. pneumoniae</i> selon les phénotypes de résistance aux β -lactamines	32

Chapitre 4: DISCUSSION

Conclusion et perspectives	38
Bibliographie.....	40
Annexes	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux caractères biochimique de <i>K. pneumoniae</i>	5
Tableau 2: Antibiotiques représentatifs des différentes sous-classes de β -lactamines	7
Tableau 3: Classification d'Ambler des β -lactamases	10
Tableau 4: Identification à l'aide de la galerie classique	12
Tableau 5: La liste des antibiotiques à tester selon les recommandations du Comité Algérienne 2014 avec leurs diamètres critique (CPM d'après EUCAST 2018).....	14
Tableau 6: Interprétation des résultats de MCNPT	21
Tableau 7: Les principaux caractères des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur Mac Conkey	22
Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats des tests biochimiques réalisés	23
Tableau 9: Tableau de la récolte	24
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des résultats des tests phénotypiques de la recherche des carbapénèmases	32

Liste des figures

Figure 1: Structure chimique des différentes sous-classes de β -lactamines et le noyau β -lactame	6
Figure 2: Mécanismes de résistance chez les bacilles Gram négatif.....	8
Figure 3: Schéma représentatif du test de synergie	16
Figure 4: Souche de <i>K. pneumoniae</i> productrice de BLSE (bouchon de champagne)	16
Figure 5: Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.....	17
Figure 6: Réalisation de Hodge test modifié (photo personnelle).....	18
Figure 7: Test de Hodge modifié.....	18
Figure 8: E-test® M β L IP/IPI: imipénème \pm EDTA [bioMérieux]	19
Figure 9: Lecture de Carba NP test d'après	21
Figure 10: Aspect macroscopique des isolats sur Mac Conkey	22
Figure 11: Observation microscopique avec coloration de Gram de <i>K. pneumoniae</i>	23
Figure 12: Répartition des <i>K. pneumoniae</i> uropathogène selon les mois de prélèvement.....	26
Figure 13: Répartition des isolats en fonction d'hospitalisation	26
Figure 14: Répartition des patients selon l'âge	27
Figure 15: Répartition des patients selon le sexe	27
Figure 16: L'antibiogramme d'une souche de <i>K. pneumoniae</i>	28
Figure 17: Profil de résistance des <i>K. pneumoniae</i> aux β -lactamines	28
Figure 18: Test de synergie positif chez souches de <i>K. pneumoniae</i> (BLSE+)	29
Figure 19 : Test du double disque (test positif).....	29
Figure 20 : Résultat du test de Hodge modifié.....	30
Figure 21 : Résultats d'E-test M β L.....	31
Figure 22: Carba NP test modifié.....	31

Liste des abréviations

ADH: Arginine di-hydrolase
AMC: amoxicilline+ acide clavulanique
ATM: Aztréonam
AX: Amoxicilline
BGN: Bacilles à Gram Négatif.
BLSE: β -lactamase à spectre élargi
NP: Nordmann-Poirel
C1G : céphalosporines de 1^{ère} génération
C3G : céphalosporines de 3^{ème} génération
CAZ : céftazidime
CMI : concentration minimal inhibitrice
CPM : céfépime
CTAB : cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
CTLC: Céfotaxime + acide clavulanique + cloxacilline
CTX : céfotaxime
CZ : céfazoline
EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique
ERT : Ertapénème
EPC : entérobactéries productrices des carbapénèmases
EU-CAST: European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing
FOX : Céfoxitine
GLU : glucose
GN : gélose nutritif
H₂S : hydrogène sulfuré
IND : indole
IPM : Imipénème
KPC : *K. pneumoniae* productrice de carbapénèmases
KpBLSE+ : *K. pneumoniae* productrice de β -Lactamases à spectre étendu
LDC : Lysine décarboxylase
LPS : Lipopolysaccharide
M β L: métallo- β -Lactamases.
MCNPT: modified carba NP test

MH : Mueller-Hinton.

MHT : Modified Hodge Test

NDM : New Delhi métallob- β -lactama

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside

OXA : Oxacillinases

PLPs : protéines liant les pénicillines

RM : Rouge de Méthyle

TDA : Tryptophane désaminase

TSI : Triple Sugar Iron

VP : Voges-Proskauer

Introduction

Introduction

L'infection urinaire est un motif fréquent de consultation et de prescription en médecine générale. Elle représentait le deuxième site d'infection bactérienne après l'appareil respiratoire (Vorkauffer, 2011), parmi les micro-organismes les plus incriminés dans ces infections, les bacilles à Gram négatif (BGN), dont on cite, la famille des *Enterobacteriaceae* (Bouguenoun, 2017)

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui fait partie des espèces commensales responsables d'infections urinaires d'origine communautaire et nosocomiales (Chevet, 2012).

La bactérie développe plusieurs stratégies pour résister à l'action des antibiotiques: la modification de la cible, l'imperméabilité et l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, Cette dernière se fait par la sécrétion d'enzymes telle que les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sécrétés par un grand nombre de bactéries et qui inhibent presque totalité des β -lactamines qui constituent la plus vaste famille d'antibiotiques et les plus utilisés. (Qachaou, 2011)

Les β -lactamines sont des antibiotiques préférentiellement utilisés contre les bactéries à Gram négatif, la dissémination mondiale des bactéries multi-résistantes produisant des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou des carbapénèmases est une préoccupation générale ainsi qu'une menace pour la santé publique. (Boutal, 2017)

L'augmentation à l'échelle mondiale de la résistance de *K. pneumoniae* productrices de BLSE constitue une menace importante pour la santé publique, puisque des souches de *K. pneumoniae* BLSE+ résistantes à toutes les β -lactamines. Les souches résistantes aux β -lactamines sont souvent résistantes aux autres familles d'antibiotiques laissant le champ thérapeutique très réduit (Sekhri-Arafa, 2010). Le sexe et l'âge sont des facteurs de risque importants pour contracter une infection urinaire. De façon générale toutes catégories d'âges sont à risque d'infection mais les femmes sont les plus touchées par ces infections et plus particulièrement les jeunes femmes sexuellement actives. (Thirion et Williamson, 2003)

C'est dans ce contexte général que nous avons choisi de mener ce travail du mémoire sur qui a pour objectifs:

- L'étude de l'émergence des souches de *K. pneumoniae* uropathogènes isolées au laboratoire de bactériologie de l'hôpital d'EL-Hakim Saâdan-Biskra;
- Evaluer le taux de la résistance aux β -lactamines des souches de *K. pneumoniae* ;

- La recherche phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines des isolats.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I. Les infections urinaires

1. Définition

Une infection urinaire correspond à l'agression d'un tissu par un ou plusieurs micro-organismes, générant une réponse inflammatoire et des signes ou des symptômes de nature et d'intensité variable. (Ghourri *et al.*, 2014)

2. Type des infections urinaires

2.1. Infection urinaire simple

Ce sont des infections urinaires survenant chez des patients sans facteur de risque de complication. (Saghir, 2018)

2.2. Infection urinaire à risque de complication

Ce sont des infections urinaires survenant chez des patients ayant au moins un facteur de risque pouvant rendre l'infection plus grave et le traitement plus complexe. (Saghir, 2018)

2.3. Infection urinaire récidivante

L'infection urinaire récurrente est définie comme étant la survenue de deux infections urinaires non compliquées en l'espace de six mois ou plus traditionnellement, comme étant l'obtention de 2, 3 cultures positives au cours des 12 mois précédents. (Saghir, 2018)

2.4. Infection urinaire grave

Qu'elle soit initialement simple ou à risque de complication, une infection urinaire peut s'accompagner d'un sepsis grave, ou d'un choc septique. (Saghir, 2018)

3. Les facteurs de risques des infections urinaires

3.1. Facteurs liés à l'hôte

3.1.1. Facteurs urologiques

Anomalies de l'appareil excréteur, corps étrangers intravésicaux, manœuvres iatrogènes (sondage, endoscopie, chirurgie urologique) (Ouattara, 2013)

3.1.2. Facteurs selon le terrain

Le sexe féminin à cause de la courte taille de l'urètre, la grossesse et la ménopause par modification hormonale, l'âge, le diabète, la constipation, les vessies neurologiques, les vêtements moulants. (Ouattara, 2013)

3.2. Facteurs liés à l'agent pathogène

Virulence, résistance aux antibiotiques. (Bouguenoun, 2017)

4. Mode de contamination

Dans la très grande majorité des cas, les germes en cause sont d'origine endogène, il s'agit d'une auto contamination. Des germes d'origine digestive étant transportés depuis l'anus jusqu'au méat urinaire où ils peuvent ensuite remonter le circuit de l'urine pour envahir

notamment l'urètre et la vessie on parle des urétrites, cystite. Ils représentent la majorité des cas mais il arrive que les germes atteignent les reins: il s'agit alors d'une pyélonéphrite. (Saghir, 2018)

Pour les infections urinaires communautaires *E. coli* est la bactérie la plus fréquemment rencontrée (70 à 95%). Elle est suivie par les autres entérobactéries (10 à 25%), particulièrement *Proteus spp* et *Klebsiella spp*. (Saghir, 2018)

II. *Klebsiella pneumoniae*

1. Taxonomie

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19^{ème} siècle. L'espèce type est *K. pneumoniae*, connue autre fois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie. (Belbel, 2013)

Le genre *Klebsiella* comporte actuellement cinq espèces *K. pneumoniae* comportent 3 sous espèces: *K. pneumoniae subsp Pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp ozanae* et *K.pneumoniae subsp Rhinoscleromatis*; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella ornithinolytica*; *Klebsiella terrigena* et *Klebsiella planticola*. (Abid et al., 2007)

2. Habitat

Elles sont retrouvées fréquemment dans le sol, les eaux de surface ou eaux usées et les végétaux. Elles se fixent sur les plantes, notamment au niveau des racines ; et fixent à leur niveau l'azote atmosphérique. *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* sont régulièrement présentes dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Elles sont isolables en quantité significative (>10⁴ bactéries par gramme) dans 30% des selles d'individus n'ayant aucune pathologie digestive. (Joly et Reynaud, 2003)

3. Les caractères morphologiques

Les Klebsielles sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 µm sur 3 µm environ, à extrémités arrondies, se présentant de manière isolée, groupés en diplobacilles ou en courtes chaînettes. Cette bactérie se distingue par son immobilité constante, elle est asporogène, capsulée mais cette dernière peut être absente chez 5% des souches. (Belbel, 2013)

4. Les caractères cultureux

K. pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, gélose éosine bleu de méthylène) après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37°C, les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine. (Belbel, 2013)

5. Les caractères biochimiques

Ce sont des bactéries ayant une oxydase négative, nitrate réductase positive, uréase positive, Réaction de Vogues-Proskauer positive (VP+) et qui fermente le glucose avec production de gaz (Lagha, 2015). Les principaux caractères biochimiques de *K. pneumoniae* sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1: Principaux caractères biochimique de *K. pneumoniae*. (Joly et Reynaud, 2003)

les résultats des tests biochimiques de <i>K. pneumoniae</i>												
GLU	IND	ONPG	Gaz	mobilité	VP	RM	TDA	H ₂ S	ODC	ADH	LDC	Citrate
+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

(+): Test positive, (-): Test négative, **GLU**: Glucose, **IND**: Indole, **ONPG**: Orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside, **VP**: Vogues-Proskauer, **RM**: Rouge de méthyle, **TDA**: Tryptophane désaminase, **H₂S**: Hydrogène sulfuré, **ODC**: Ornithine décarboxylase, **ADH**: Arginine dihydrolase, **LDC**: Lysine décarboxylase.

6. Pouvoir pathogène

6.1. Capsule

Leur capsule a été le premier facteur de virulence décrit. Elle confère à *K. pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose. C'est une véritable enveloppe de nature polysaccharidique présentant un antigène k. (Kassis-Chikhani, 2012)

6.2. Lipopolysaccharide (LPS)

Est forme de plusieurs composés; le lipide A de structure oligosaccharidique, et l'antigène O. le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique. (Kassis-Chikhani, 2012)

6.3. Fimbriae (adhésine)

- **Fimbriae de type 1**, sont essentiels à l'attachement initial stable de plusieurs souches de *K. pneumoniae* sur les surfaces inertes. Chez *K. pneumoniae* ces fimbriae sont également impliqués dans la formation des biofilms. (Schembri *et al.*, 2005)

- **Fimbriae de type 3**, impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Ces structures semblent faciliter l'adhésion à des supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm. (Kassis-Chikhani, 2012)

6.4. Sidérophore

En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection. (Kassis-Chikhani, 2012)

III. Les β -lactamines et *K. pneumoniae*

1. Définition des β -lactamines

Les β -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur efficacité, leur faible toxicité et leur faible coût pour certaines molécules bactéricides (Labid, 2014). L'élément structural commun à toutes les molécules de cette famille est le noyau β -lactame. En fonction des cycles et chaînes latérales ajoutés à ce noyau on distinguera 4 sous familles les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Chaque sous-famille aura sa propre biodisponibilité et son spectre d'activité (fig.1). (Boutal, 2017)

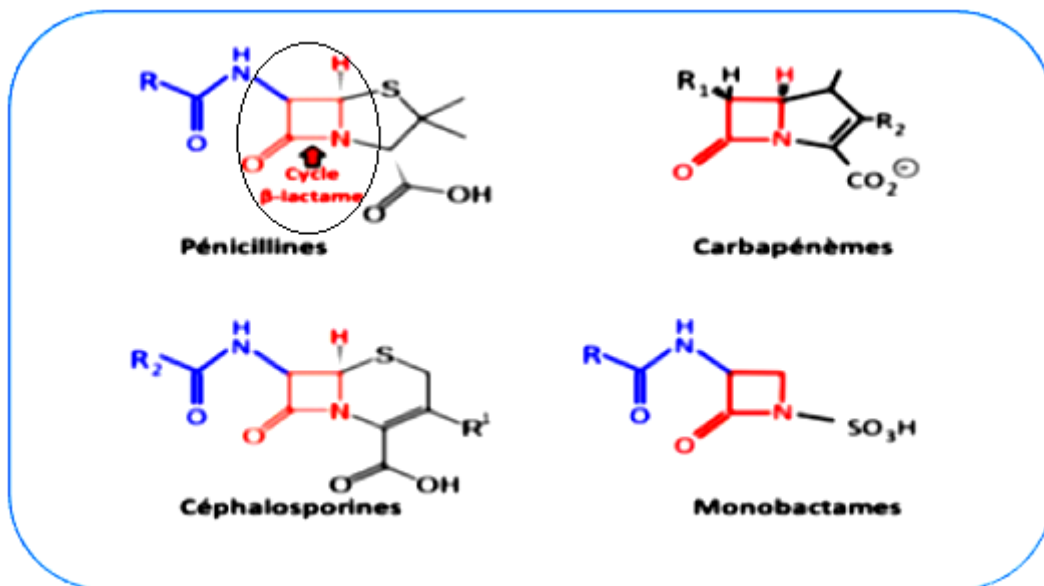


Figure 1: Structure chimique des différentes sous-classes de β -lactamines et le noyau β -lactame (Boutal, 2017)

2. Les sous-familles des β -lactamines

Les antibiotiques de la famille des β -lactamines sont classés en quatre sous classes: pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames aux quelles il faut ajouter les inhibiteurs de β -lactamases, qui ne sont pas des antibiotiques mais des molécules permettant l'inhibition de certains mécanismes de résistance aux β -lactamines utilisés par les bactéries. Le tableau 2 présente chacune de ces sous-classes. (Maleck, 2014)

Tableau 2: Antibiotiques représentatifs des différentes sous-classes de β -lactamines. (Maleck, 2014)

Sous-classes de β -lactamines	Antibiotiques représentatifs
Pénicillines	
Benzyl-pénicillines	Pénicilline G
Isoxazolyl-pénicillines	Cloxacilline, oxacilline
Amino-pénicillines	Ampicilline, amoxicilline, pivampicilline
Uréido-pénicillines	Pipéracilline, azlocilline
Carboxy-pénicillines	Carbénicilline, ticarcilline
Amidino-pénicillines	Mécillinam, pivmécillinam
Céphalosporines	
Première génération	Céfalexine, céfalotine, céfazoline
Deuxième génération	Céfoxitine, céfuroxime, céfotétan
Troisième génération	Céfotaxime, céftazidime, céftriaxone, céfixime
Quatrième génération	Céfépime, céfpirome, céfquinome
Monobactames	Aztréonam
Carbapénèmes	Imipénem, méropénem, ertapénem
Inhibiteur de β-lactamines	Acide clavulanique, sublactam, tazobactam

3. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines agissent sur la membrane des bactéries. En effet elles se fixent aux protéines liant les pénicillines PLPs (les transpeptidases et les carboxypeptidases), indispensables à la formation du peptidoglycane. L'inhibition de ces enzymes fait accumuler des précurseurs du peptidoglycane qui activent le système autolytique de la bactérie, entraînant ainsi sa lyse. (Traore, 2009)

4. Les mécanismes de résistance de *K. pneumoniae*

4.1. Résistance naturelle

K. pneumoniae appartient au groupe 2 de la classification des entérobactéries en fonction de leur résistance naturelle aux β -lactamines. Cette espèce possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique (avec plusieurs variants SHV, LEN, OKP) qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines (amino-, carboxy- et uréido-pénicillines). En conséquence, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline)+acide clavulanique et pipéracilline+tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. (Kassis-Chikhani, 2012)

4.2. Résistance acquise

Les résistances acquises dues à des modifications génétiques, chromosomiques ou plasmidiques. Elles ne concernent que quelques souches, d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique donné (Traore, 2009). (fig. 2)

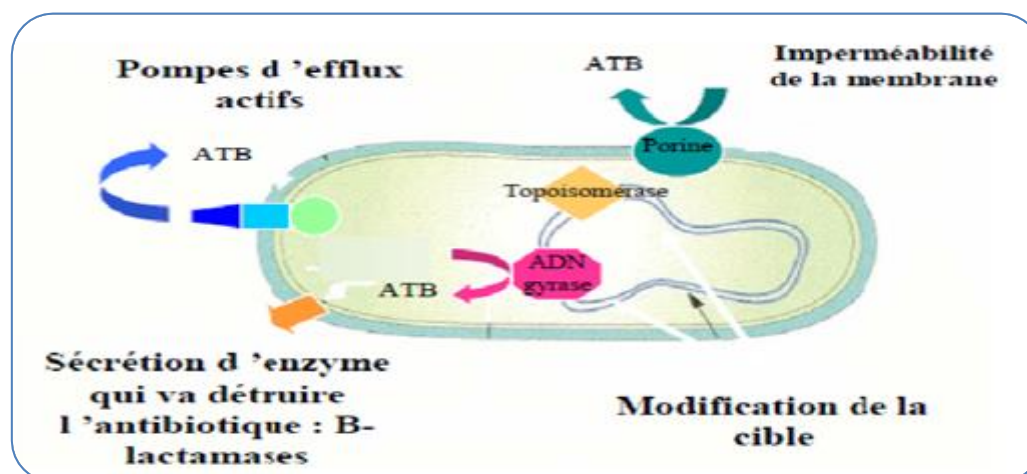


Figure 2: Mécanismes de résistance chez les bacilles Gram négatif (El mahi, 2013)

4.2.1. Résistance non enzymatique

4.2.1.1. Modification de la cible

Les cibles des β -lactamines sont des protéines enzymatiques insérées dans la surface externe de la membrane cytoplasmique dénommées protéine liant la pénicilline (PLP). Les PLPs interviennent dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane constituant principal de la paroi bactérienne. Les PLP sont des cibles physiologiques des antibiotiques de la famille des β -lactamines. Des modifications des PLP par mutation ont été impliquées dans la résistance aux β -lactamines. (Bouguenoun, 2017)

4.2.1.2. Imperméabilité

Les β -lactamines ont deux possibilités pour traverser la membrane bactérienne: passer à travers des canaux membranaires spécifiques (porines) ou diffuser à travers la bicouche

phospho-lipidique (Maleck, 2014). La diminution quantitative ou qualitative au niveau de ces porines peut freiner la pénétration intra cellulaire des agents anti microbiens, et conférer de ce fait, un bas niveau de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. (Hadeq, 2016)

4.2.1.3. Pompe à efflux

Les bactéries possèdent une machinerie, constituée de pompes à efflux, capable d'expulser les déchets du métabolisme hors de la cellule. Ces mêmes pompes peuvent être impliquées dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques en limitant l'accumulation de la molécule au contact de sa cible. (Boutal, 2017)

4.2.2. Résistance enzymatique

La classification d'Ambler proposée en 1980, sépare les β -lactamases en quatre classes principales (A à D) en fonction de l'homologie de la séquence d'acides aminés. Les classes A, C et D sont des β -lactamases avec sérine à leur site actif, tandis que la classe B (également connu comme les métallo- β -lactamases) ont du zinc sur leur site actif (Hirsch et Tam, 2010), le tableau 3 résumé les classes d'Ambler des β -lactamases.

4.2.2.1. Les β -lactamases de classe A « les pénicillinases »

La classe A comprend des enzymes à serine-active inhibées par l'acide clavulanique hydrolysant préférentiellement des pénicillines et, à moindre degré, les céphalosporines. Le support génétique est chromosomique ou plasmidique. Cette classe comprend des β -lactamases à spectre restreint (TEM-1, TEM-2, SHV-1), des β -lactamases résistantes aux inhibiteurs (TEM-30 à 45, TEM-59), des β -lactamases à spectre étendus ou BLSE (SHV-2 à SHV-9, TEM-3 à TEM-29, CTX-M, PER-1, VEB-1) et des carbapénèmases (NmcA, IMI-1, KPC). (Illiaquer, 2010)

4.2.2.2. Les β -lactamases de classe B « les métallo- β -lactamases»

La classe B comprend les métalloenzymes, inhibés par l'EDTA (Liazid, 2012). La particularité des M β L est qu'elles sont capables d'hydrolyser les carbapénèmes et la quasi-totalité des pénicillines et des céphalosporines et sont insensibles aux inhibiteurs de β -lactamases. (Maleck, 2014)

4.2.2.3. Les β -lactamases de classe C « les céphalosporinases»

Les β -lactamases du groupe C sont des céphalosporinases (type AmpC) codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006). Elle est constituée d'enzyme à sérine capable d'hydrolyser les céphalosporines. Elles restent insensibles à l'action de l'acides clavulanique. Leur action est inhibée *in vitro* par la cloxacilline. (Illiaquer, 2010)

4.2.2.4. Les β -lactamases de classe D «les oxacillinase»

La classe D regroupe les β -lactamases hydrolysant préférentiellement l'oxacilline et la cloxacilline et conférant une résistance à l'ampicilline et à la céfalotine. Ces enzymes présentent une faible affinité pour l'acide clavulanique et ne sont donc pas inhibées par celui-ci. Ces enzymes ont acquis la capacité d'hydrolyser les céphalosporines (céfotaxime, céftriaxone) ou les monobactames (aztréonam) (Maleck, 2014). Les oxacillinases classiques sont inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium. (Leulmi, 2015)

Tableau 3: Classification d'Ambler des β -lactamases (Lecour, 2017)

Ambler	Site actif	Enzyme	Inhibiteur	Substrat
A	Sérine	Pases à spectre restreint	Clavulanate	Pénicillines
A	Sérine	Pases à large spectre	Clavulanate	Pénicillines + C1G
A	Sérine	BLSE	Clavulanate	Pénicillines+céphalosporines
A	Sérine	Pases résistante aux inhibiteurs	-	Pénicillines
A	Sérine	Carbénicillinases	Clavulanate	Pénicillines dont carbénicilline
A	Sérine	Céfuroximases	Clavulanate	Céphalosporines
A	Sérine	Carbapénèmases	Clavulanate	Péni.+ céphalo.+ carbapénèmes
B	Zn ²⁺	Carbapénèmases	EDTA	Péni.+ céphalo.+ carbapénèmes
C	Sérine	Céphaosporinases	Cloxacilline	Céphalosporines
D	Sérine	Oxacillinases	+/- Clavulanate	Pénicillines dont cloxacilline/carba.

Pases: pénicillinases, **Péni:** pénicilline, **Céphalo:** céphalosporines, **Carba:** carbapénèmes, **C1G:** céphalosporines de troisième génération, **BLSE:** β -lactamases à spectre étendu, **EDTA:** acide éthylène-diamine-tétra-acétique.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude

L'étude a été réalisée au sein du laboratoire de bactériologie de l'hôpital EL-Hakim Saâdan de Biskra précisément au niveau de la paillasse des infections urinaires, et au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université M^{ed} Khider-Biskra (El-hadjeb).

2. Echantillonnage

Quarante-deux (42) souches non répétitives de *Klebsiella pneumoniae* issues de prélèvements cliniques ont été recueillies au cours d'une période de 5 mois (le 1^{er} Octobre 2018 à 28 Février 2019).

Les souches de *K. pneumoniae* ont été isolées à partir des urines chez des patients des deux sexes et de différent âge. Les isolats ont été apportées au laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université M^{ed} Khider-Biskra et repiquées dans des tubes de gélose nutritive (GN) inclinés incubés à 37°C pendant 24h et ensuite conservées à +4°C.

3. Isolement et purification

Après la période de collecte, les souches ont été ré-isolées et purifiées -au cas de contamination- sur le milieu Mac Conkey dont l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h.

4. Identification

4.1. Etude macroscopique

Elle permet d'obtenir des colonies isolées sur les milieux gélosés coulés en boîte de Pétri. L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. La culture se fait à la température de 37°C et un temps d'incubation de 18 heures à 24 heures. (Ouattara, 2013)

4.2. Etude microscopique "Etat frais et coloration de Gram"

L'état frais c'est une méthode rapide qui consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif x40. Les bactéries sont vivantes, on peut alors déterminer des caractères tels que la morphologie générale, la mobilité et le groupement (bacille ou coque) ainsi que le type de colonies. (Solbi, 2013)

La coloration de Gram, permet d'étudier les affinités tinctoriales des germes, renseignant aussi sur la prédominance des espèces présentes. Il peut s'agir d'une espèce pure ou au contraire d'une flore complexe. Le résultat est déclaré en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (Annexe1). (Leulmi, 2015)

4.3. Tests d'orientation et d'identification biochimique (galerie classique)

La réalisation de la galerie classique consiste à effectuer des tests biochimiques permettant l'identification des bactéries en étudiant leur métabolisme enzymatique (tab.4). Les figures présentant les résultats dans l'annexe 2.

Tableau 4: Identification à l'aide de la galerie classique

Test	Technique	Lecture
Test de l'oxydase (Liazid, 2011)	Etaler sur le disque d'oxydase une partie de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile.	Une réaction positive se traduit par une coloration violette en quelques seconds, qui met en évidence la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semiquinonique rose violacé.
Test de la catalase (Reiner, 2010; Meziani, 2012)	Une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri et déposée sur une lame. Une goutte de H ₂ O ₂ est déversée sur cette colonie.	Les réactions positives se manifestent par une effervescence immédiate (formation de bulles).
Test VP et RM (Meziani, 2012; Leulmi, 2015)	Ensemencer le milieu Clarck et Lubs avec la souche bactérienne. Après avoir incubé à 37°C pendant 18h. diviser le milieu en deux tubes, pour le test RM additionner 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. Et pour le de VP ajouter quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume du réactif VP2.	La lecture de ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation du glucose. Le test RM consiste à mettre en évidence la voie de fermentations des acides mixtes qui consiste à apprécier le pH du milieu après 24h de culture; Le test VP consiste à mettre en évidence l'acétoïne produit par fermentation butanediolique, par une réaction colorée en rose après 15 min.
Test urée-indole (Meziani, 2012)	On ensemence le milieu «urée-indole» directement à partir des colonies de <i>K. pneumoniae</i> à l'aide d'une anse de platine. Après l'incubation à 37°C pendant 24h. Le	L'Uréase est mis en évidence par changement de coloration du milieu vers le rose, et la production de l'indole se traduit par un anneau rouge en surface après l'ajoute de Kovacs, alors que la

	milieu est divisé en deux tubes. On peut rechercher la production d'indole par des réactifs de Kovacs, et le TDA est révélé par l'ajoute de perchlorure de fer.	tryptophane-désaminase détecté par l'apparition d'une couleur brune après l'ajoute de perchlorure de fer.
Test TSI (Souana, 2010)	Elle consiste à ensemencer en stries serrées la pente de la gélose puis par piqûre centrale le culot, la lecture se fait après 18 h d'incubation à 37°C	La production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la masse du culot. La fermentation du glucose et /ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la masse du culot. La production de H ₂ S se traduit par noircissement du milieu.
Milieu de citrate de Simmons (Solbi, 2013)	L'ensemencement se fait au moyen d'une anse de platine par des stries transversal de la pente, la lecture se fait après 24h d'incubation à 37°C.	L'utilisation du citrate de Simmons se traduit par un virage de couleur du vert au bleu qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède un citrate perméase.
Milieu mannitol-mobilité-nitrate réductase (Meziani, 2012; Solbi, 2013)	L'ensemencement du milieu se fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une pipette Pasteur. L'incubation se fait à 37°C durant 18h. le type respiratoire est défini en ajoutant, à la surface du milieu, les réactifs de Nit1 et Nit2, il est possible de mettre en évidence le nitrite, si la bactérie possède une nitrate-réductase.	La fermentation du mannitol a été matérialisée par un virage du milieu de rouge au jaune. L'ajoute des réactifs Nit1 et Nit2 conduit à l'apparition d'une teinte rouge-orangé en présence d'ions nitrites, ce qui indique que la bactérie est capable de réduire les nitrates en nitrites. La bactérie immobile ne se développe que le long de la piqure centrale.

5. L'étude de la sensibilité aux β -lactamines

5.1. Antibiogramme

La souche ensemencée va entrer en contact avec des concentrations variables de l'antibiotique et la croissance sera inhibée là où sera atteinte la concentration minimale inhibitrice (CMI). L'inhibition va se traduire par une zone circulaire dépourvue de culture autour du disque. (Ouattara, 2013)

• Technique

✓ Tremper un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne d'une densité comparée à un étalon de 0.5 McFarland;

✓ Décharger en le pressant fermement sur la paroi interne du tube;

✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée en stries serrées;

✓ Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois;

✓ Recharger l'écouvillon pour chaque boîte de Pétri;

✓ L'application des disques d'antibiotiques se fait manuellement avec une pince stérile;

✓ Les boîtes incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h. (Sekhri-Arafa, 2011)

• Lecture interprétative

La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition du disque d'antibiotique; on dit que le germe est sensible, résistant ou intermédiaire (Ouattara, 2013). Les diamètres d'inhibition ont été interprétés selon les recommandations du Comité Algérienne 2014 (CD ROM, 2014). La liste des antibiotiques testés est illustrée dans (tab.5).

Pour vérifier la validité des disques et la conformité du milieu Muller Hinton une souche de référence a été utilisée (*E. coli* ATCC 25922).

Tableau 5: La liste des antibiotiques à tester selon les recommandations du Comité Algérienne 2014 avec leurs diamètres critique (CPM d'après EUCAST 2018)

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge ($\mu\text{g/ml}$)	Diamètre critique		
				$\geq S$	I	$\leq R$
β - lactamines	Amoxicilline	AX	10	17	14-16	13
	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10	18	14-17	13
	Céfoxitine	FOX	30	18	15-17	14
	Céfotaxime	CTX	30	26	23-25	22

	Céfazoline	CZ	30	15	/	14
	Céftazidime	CAZ	30	21	18-20	17
	Atzréonam	ATM	30	21	18-20	17
	Ertapénème	ERT	10	22	19-21	18
	Céfipime	CPM	30	27	/	21
	Cefotaxime + a. clavulanique + cloxacilline	CTLC (Antibiotique test)	/	/	/	/

5.2. Analyses phénotypiques des mécanismes de résistance

5.2.1. La recherche phénotypique de β -lactamines à spectre étendu (BLSE)

5.2.1.1. Test de synergie

• Principe

Le teste de synergie permet la détection de β -lactamases à spectre étendue chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céfotaxime, céftazidime, céfepime et l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne". (Lagha, 2015)

• Technique

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme (Belbel, 2013). Le test de synergie est réalisé en disposant les disques d'AMC et de la céphalosporine de troisième génération (C3G) choisie (et de l'aztréonam) à 30 mm de distance, centre à centre (Émile, 2008). Les disques d'antibiotiques utilisés: l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC), la céftazidime (CAZ), la céfotaxime (CTX), la Céfotaxime+acide clavulanique+cloxacilline (CTLC) et l'aztréonam (ATM) sont placés sur la gélose Mueller Hinton selon le schéma ci-dessous. L'incubation des boîtes se fait 18 à 24 heures à 37°C. (Belbel, 2013)

• Lecture

La production de BLSE a été considérée comme positive lorsque la zone d'inhibition autour d'un disque antibiotique a été renforcée vers le disque AMC (fig.3, fig.4). (Saha et Jhora, 2018). En absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G. (Rahal *et al.*, 2011)

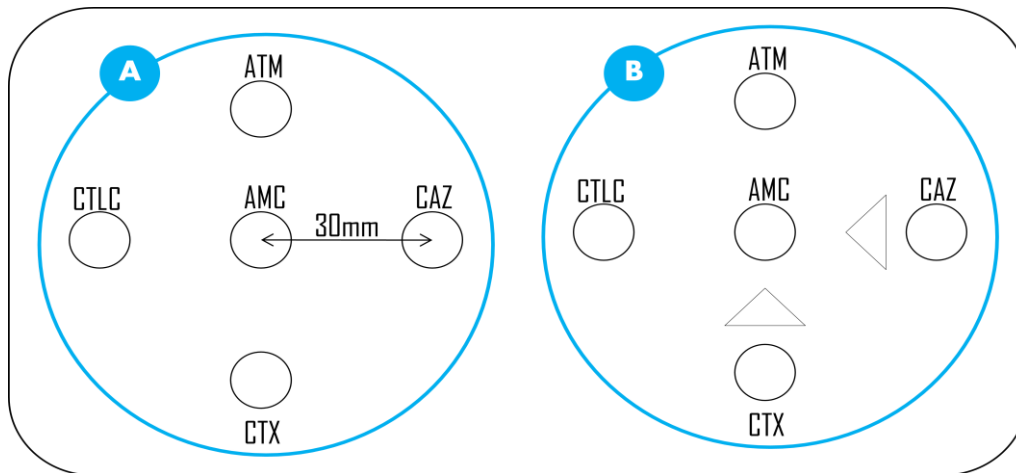


Figure 3: Schéma présentatif du test de synergie

A; la disposition des disques, B; le résultat positif du test de synergie

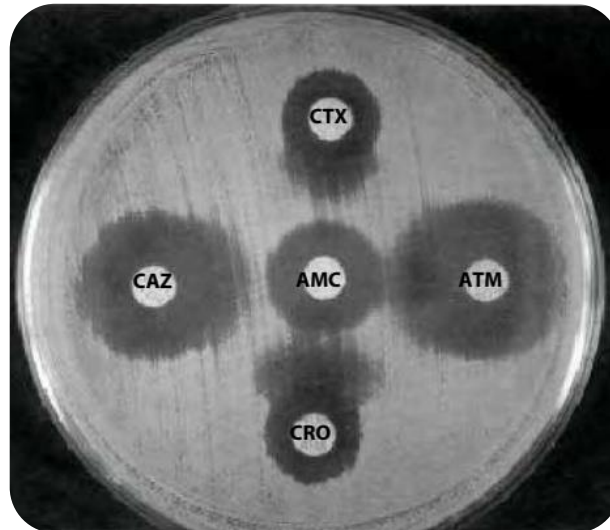


Figure 4: Souche de *K. pneumoniae* productrice de BLSE (bouchon de champagne) (Rahal *et al.*, 2011)

5.2.1.2. Test du double disque (test espagnol)

• Principe

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton. (Rahal *et al.*, 2005)

• Technique

On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques: un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25 mm. On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque

d'AMC par un disque de CTX. On incube pendant 18 h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Fig.5a). (Rahal *et al.*, 2005)

• Lecture

Le test du double disque est considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G on appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égale de 4 à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G (Fig.5b). (Rahal *et al.*, 2005)

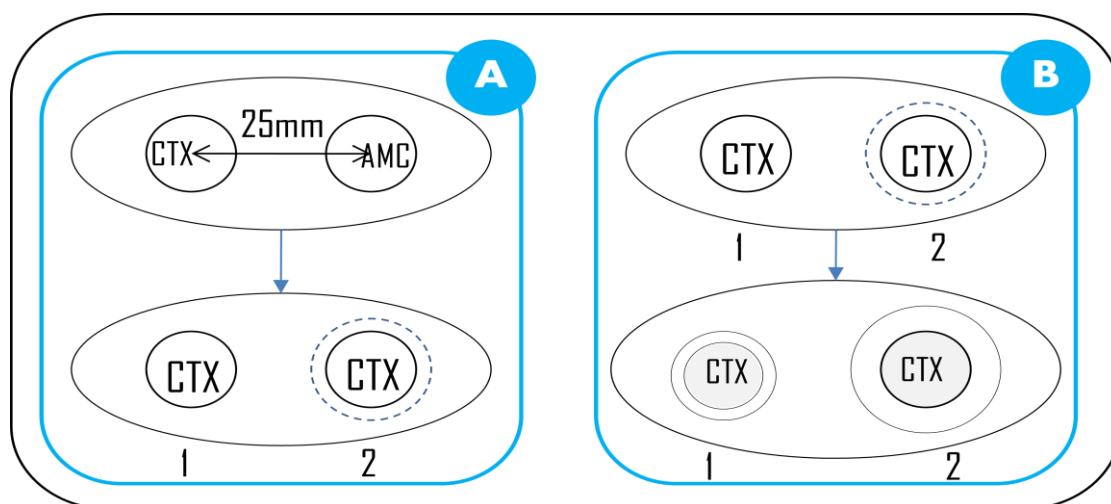


Figure 5: Schéma de détection de BLSE par le test du double disque

A; la disposition des disques, B; le résultat positive du test

5.2.2. La recherche phénotypique de carbapénèmases

5.2.2.1. Le test de Hodge modifié

• Principe

Le test de Hodge modifié (MHT) a été très utilisé comme méthode phénotypique générale de détection de la production de carbapénèmase. Ce test est sensible pour la détection des carbapénèmases, mais ne fournit pas d'information sur le type de carbapénèmase mis en cause. (Achmour, 2012)

Le test est basé sur l'inactivation d'un carbapénème par un organisme producteur de carbapénèmase, qui permet à une souche indicatrice sensible aux carbapénèmes de croître à proximité d'un disque de carbapénème le long d'une strie de la souche productrice de carbapénèmases. (Achmour, 2012)

• Technique

Ce test consistait à ensemencer en culture confluente (à l'aide d'un écouvillon) d'une suspension de la souche *E. coli* ATCC 25922 (sensible aux antibiotiques actifs sur les BGN) sur une gélose Mac Conkey. Ensuite, un disque d'értapénème (10 μg) a été déposé au centre de la boîte. A partir du disque un ensemencement est réalisée de manière radiale jusqu'au

bord de la boîte de Pétri incluant la souche à tester, le témoin positif KPC⁺ (*K. pneumoniae* «Kpnasey» carbapénémase+) et un témoin négatif (*K. pneumoniae* carbapénémase-) ou *E. coli* ATCC 25922. (Leulmi, 2015)



Figure 6: Réalisation de Hodge test modifié (photo personnelle)

• **Lecture**

Après incubation pendant 18 h à 37°C, la présence d'une carbapénémase est révélée par une déformation de la zone d'inhibition due à l'activité enzymatique autour du disque d'antibiotique proche de la souche suspecte (fig.7). (Riethmuller, 2013)

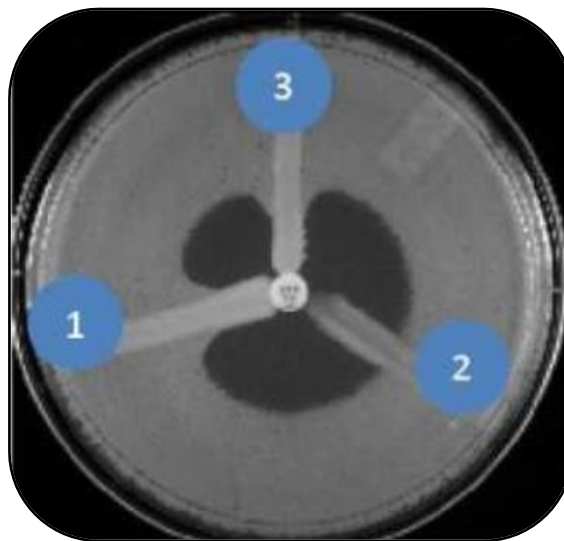


Figure 7: Test de Hodge modifié

- (1) *K. pneumoniae* « Kpnasey » : témoin positif ; (2) *K. pneumoniae* : témoin négatif ;
(3) Souche à tester (Leulmi, 2015)

5.2.2.2. Test à l'EDTA (M β L-E.test)

• **Principe**

La technique d'E-test M β L est réalisée par l'utilisation des bandelettes chargées en concentrations croissantes d'imipénème et d'EDTA (Biomérieux, France) commercialisées

(Riethmuller, 2013). Il est basé sur la possibilité qu'a l'EDTA de complexer le zinc et par conséquent d'inhiber l'action de l'enzyme. (Achmour, 2012)

• Technique

D'après (BioMérieux, 2011) la préparation de la suspension bactérienne et la technique d'ensemencement sur la gélose est du même principe que l'antibiogramme puis ;

✓ Laisser absorber l'excès d'humidité pendant environ 15 à 20 minutes afin que la surface soit complètement sèche avant d'appliquer la bandelette d'E-test M β L;

✓ Placez toujours la bandelette sur la gélose avec l'échelle de lecture vers l'ouverture de la boîte, et le côté réactif sur la surface de la gélose;

✓ Incuber à 35 ± 2 ° C pendant 16 à 20 heures.

• Lecture

La production de M β L est indiquée par une réduction de la CMI de l'imipénème en présence d'EDTA (rapport CMI de IMP / IMP+EDTA ≥ 8) ou l'apparition d'une zone de synergie entre les sections IMP / IMP+EDTA (fig. 8). (Sefraoui, 2015)



Figure 8: E-test® M β L IP/IPI: imipénème \pm EDTA [bioMérieux]

5.2.2.3. Le Carba NP test modifié (MCNPT)

• Principe

Le principe de ce test se repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase. L'indicateur de pH change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénémase. Il possède une excellente spécificité et une excellente sensibilité. (Balouki, 2017)

• Préparation des solutions

✓ Préparation de la solution rouge de phénol 0.5% volume/poids

Nous avons pris 0.5g de rouge de phénol que nous avons dissous dans 100 ml d'eau distillée stérile et nous avons homogénéisé. (Adda, 2017)

✓Préparation de la solution NaOH 1N

Pour préparer la solution de NaOH 1N, nous avons dissous 4g de cristaux de NaOH dans 100 ml d'eau distillée stérile. Puis nous avons homogénéisé la solution. (Adda, 2017)

✓Préparation de la solution ZnSO₄ mM

Pour obtenir la solution de ZnSO₄, nous avons pris 0.29g de ZnSO₄ que nous avons dissout dans 100 ml d'eau distillée. Ensuite nous avons homogénéisé la solution obtenue. (Adda, 2017)

✓Préparation de la solution A

✓Nous avons mélangé 2 ml de la solution concentrée de rouge phénol (après avoir bien vortexé) dans 16.6 ml d'eau distillée;

✓Nous avons ajusté le pH environ 7.8 en ajoutant, goutte à goutte d'une solution de NaOH (1N);

✓Ensuite nous avons ajouté 180 µl d'une solution de ZnSO₄ 10 mM pour obtenir une concentration finale de ZnSO₄ à 0.1 mM. (Adda, 2017)

✓Préparation de la solution B (solution A+Imipénème) (6mg/ml)

Nous avons prélevé 10 ml de la Solution A précédemment préparée dans un flacon propre et nous y avons ajouté 60 mg d'Imipénème. Ensuite nous avons homogénéisé pour obtenir la Solution A + Imipénème. (Adda, 2017)

•Technique

✓Dans un tube Eppendorf, mettre 200µl de tampon de lyse: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB 0.02 %);

✓Suspendre une anse calibrée (10µl) de colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer 1 à 2 min;

✓Transférer 100µl dans 2 tubes Eppendorf "1" et "2";

✓Ajouter 100µl de Solution A dans le tube Eppendorf "1" et 100µl de la Solution A+imipénème 12 mg/ml (solution B) dans le tube Eppendorf "2";

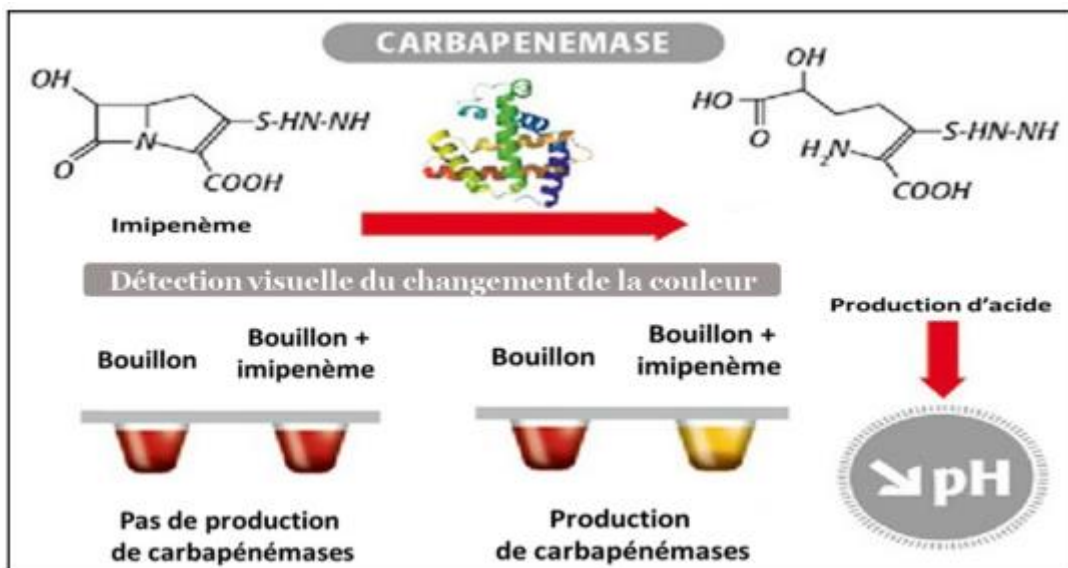
✓Vortexer 5 seconde, puis incubé à 37°C pendant un maximum de 2 heures. (Bougunoun, 2017)

•Lecture

La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube Eppendorf et les résultats sont interprétés selon le tableau ci-dessous et la figure 9.

Tableau 6: Interprétation des résultats de MCNPT (Bougunoun, 2017)

Tube 1	Tube 2	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production de carbapénémase
Rouge	Jaune / Orange	Production du carbapénémase
Jaune	Jaune	Ininterprétable

**Figure 9:** Lecture de Carba NP test d'après (Bougunoun, 2017)

Chapitre 3

Résultats

1. Isolement des souches

Notre étude a porté sur 42 souches de *K. pneumoniae* collectées au laboratoire de bactériologie de l'hôpital EL-Hakim Saâdan de Biskra durant une période allant de 01 octobre 2018 jusqu'aux 28 février 2019.

2. Identification des isolats

2.1. Observation macroscopique

L'observation des boîtes incubées montrent qu'il y a un aspect typique des colonies de *K. pneumoniae*. Le tableau ci-dessous récapitule les principaux caractères des colonies observées. (fig.10)

Tableau 7: Les principaux caractères des colonies de *K. pneumoniae* sur Mac Conkey.

Description Milieu	Forme	Aspect	Opacité	Consistance	Couleur
Mac Conkey	Ronde, bombée (régulier ou irrégulier)	Lisse	Opaque	Crémeuse Laitieuse	Rose



Figure 10: Aspect macroscopique des isolats sur Mac Conkey

2.2. Observation microscopique

L'observation microscopique à l'état frais a montré des bacilles courts et immobiles. Après la coloration de Gram (à l'objectif x100) l'observation a montré que les souches se présentent sous forme de bacilles ou diplobacilles colorées en rose. Donc ce sont des bacilles à Gram négatif (fig.11)

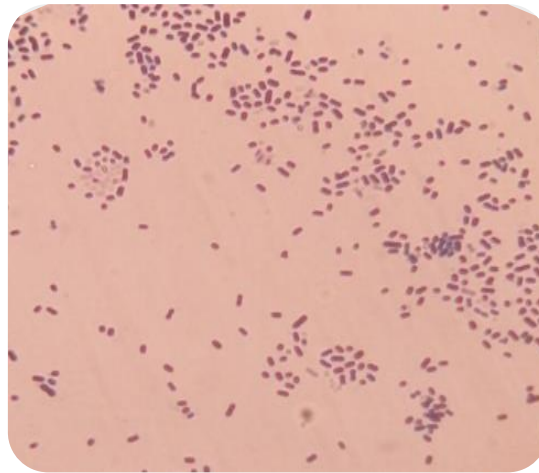


Figure 11: Observation microscopique avec coloration de Gram de *K. pneumoniae*

2.3. Identification par les testes d'orientation et la galerie classique

L'identification bactérienne a été réalisée par la galerie biochimique classique qui nous a permis de confirmer les principaux caractères biochimiques des souches *K. pneumoniae* selon les références bibliographiques. Le tableau 8 représente les résultats des tests réalisés sur les 42 souches.

Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats des tests biochimiques réalisés

		Test	Résultat
<i>K. pneumoniae</i>	Oxydase		-
	Catalase		+
	Clark et Lubs	VP	+
		RM	-
	Urée-indole	Uréase	+
		Indole	-
		TDA	-
	TSI	Glu	+
		Sac	+
		H ₂ S	-
		Gaz	+
	Mannitol-mobilité	Mannitol	+
		Nit	+
		Mobilité	-
	Citrate de Simmons		+

(+): Test positive, (-): Test négative, **VP**: Vogues-Proskauer, **RM**: Rouge de méthyle, **TDA**: Tryptophane désaminase, **H₂S**: Hydrogène sulfuré, **Glu**: Glucose, **Sach**: Saccharose, **Nit**: Nitrate réductase.

3. La collecte des souches

Les 42 souches de notre étude ont été isolées des patients des deux sexes et de différentes catégories d'âge ayant une infection urinaire dans une période précise. Le tableau 9 représente les renseignements correspondant aux isolats.

Tableau 9: Tableau de la récolte

N° de souche	Date de prélèvement	Hospitalisation	Age	Sexe
1	10/2018	Externe	10 ans	Féminin
2	10/2018	Externe	42 ans	Féminin
3	10/2018	Externe	20 ans	Masculin
4	10/2018	Interne	3 ans	Féminin
5	10/2018	Externe	36 ans	Féminin
6	10/2018	Externe	7 ans	Féminin
7	10/2018	Externe	34 ans	Féminin
8	10/2018	Externe	46 ans	Féminin
9	10/2018	Externe	38 ans	Masculin
10	10/2018	Externe	73 ans	Masculin
11	10/2018	Externe	38 ans	Féminin
12	10/2018	Externe	62 ans	Féminin
13	10/2018	Externe	7 ans	Féminin
14	10/2018	Interne	7 mois	Masculin
15	10/2018	Intérieur	5 mois	Masculin
16	10/2018	Externe	23 ans	Féminin
17	10/2018	Externe	64 ans	Masculin
18	10/2018	Externe	35 jours	Masculin
19	10/2018	Externe	25 ans	Féminin
20	11/2018	Externe	8 mois	Masculin
21	11/2018	Externe	11 ans	Masculin
22	11/2018	Externe	32 ans	Masculin
23	11/2018	Externe	18 ans	Féminin

24	11/2018	Externe	25 ans	Féminin
25	11/2018	Externe	34 ans	Féminin
26	11/2018	Externe	71 ans	Féminin
27	12/2018	Externe	68 ans	Masculin
28	12/2018	Externe	47 ans	Masculin
29	12/2018	Externe	34 ans	Masculin
30	12/2018	Externe	52 ans	Masculin
31	01/2019	Externe	7 ans	Féminin
32	01/2019	Externe	6 ans	Masculin
33	02/2019	Externe	22 ans	Féminin
34	02/2019	Externe	31 ans	Féminin
35	02/2019	Externe	19 ans	Masculin
36	02/2019	Externe	50 ans	Féminin
37	02/2019	Interne	2 mois	Masculin
38	02/2019	Externe	4 ans	Féminin
39	02/2019	Interne	1 an	Masculin
40	02/2019	Externe	36 ans	Féminin
41	02/2019	Interne	9 mois	Masculin
42	02/2019	Externe	43 ans	Féminin

4. Répartition des souches étudiées

4.1. La répartition des *K. pneumoniae* uropathogène en fonction des mois de prélèvement

Au cours de la période de collecte (5 mois), le taux des patients ayant une infection urinaire à *K. pneumoniae* a atteint un seuil élevé au mois d'octobre (45.23%), par apport au le taux le plus faible qui a été en mois de Janvier (4.76%) (fig. 12).

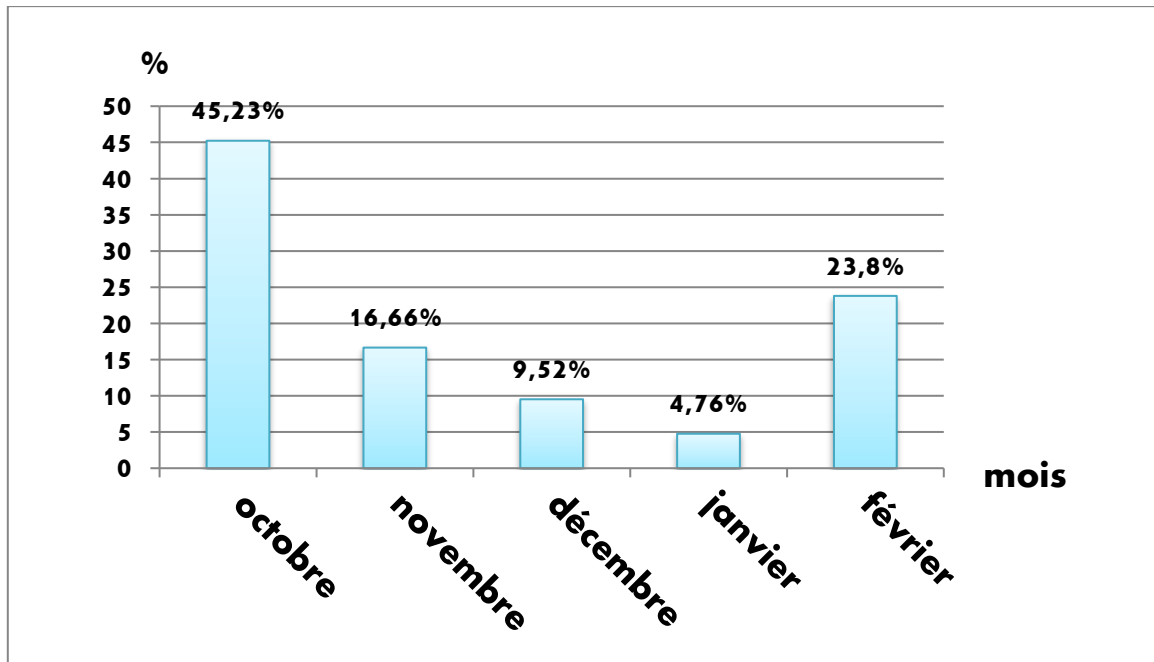


Figure 12: Répartition des *K. pneumoniae* uropathogène selon les mois de prélèvement

4.2. La répartition des isolats en fonction d'hospitalisation

Notre résultat de la répartition de *K. pneumoniae* en fonction d'hospitalisation représente une fréquence des malades externes par rapport aux internes, où le taux de ces derniers est 16.66%. (fig.13)

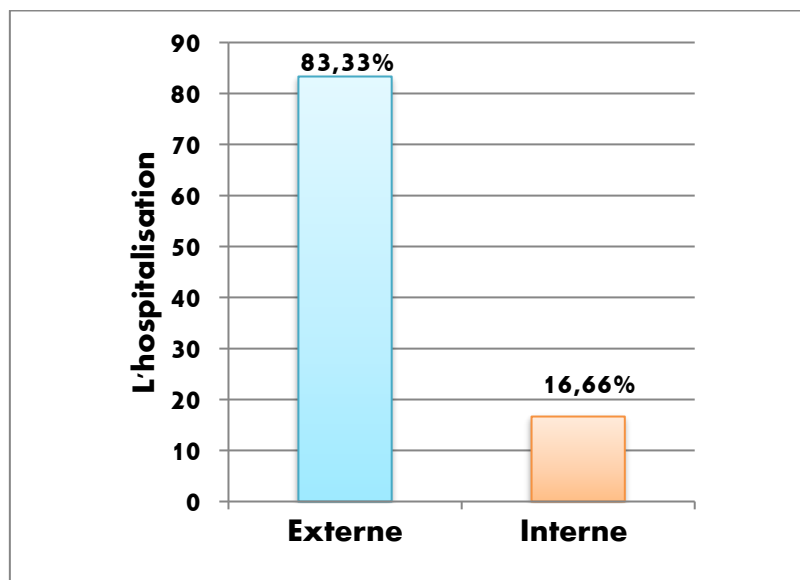


Figure 13: Répartition des isolats en fonction d'hospitalisation

4.3. La répartition des isolats en fonction de l'âge

D'après les classes d'âge, la répartition a été faite sur quatre catégories; les enfants (inférieur à 14 ans), les adolescents (15-24 ans), les adultes (25-64 ans) et les âgées (supérieur à 64 ans). Dans notre étude, la catégorie la plus touchée par *K. pneumoniae* uropathogène est

celle des adultes, avec un pourcentage de 45.24%, suivi par la catégorie des enfants (35.71%) (fig. 14).

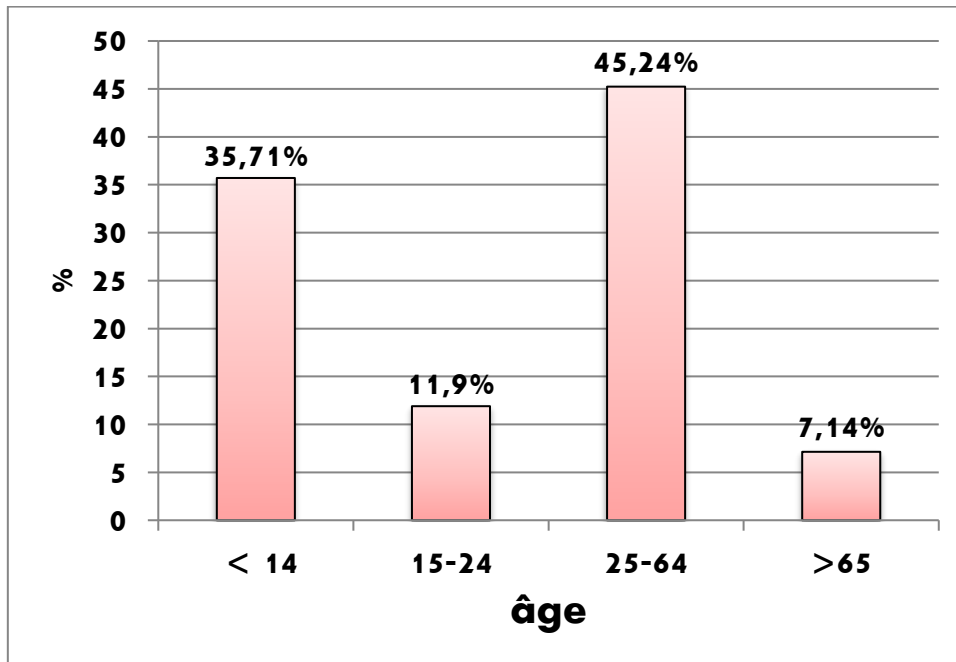


Figure 14: Répartition des patients selon l'âge

4.4. La répartition des isolats en fonction du sexe

Au total de 42 patients, le sexe féminin est le plus touché par les infections urinaires à *K. pneumoniae* avec un taux de 55% par rapport au sexe masculin (45%) (fig. 15).

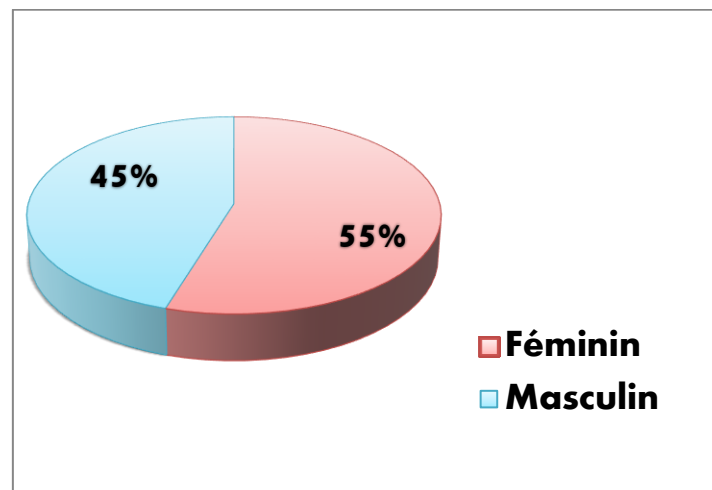


Figure 15: Répartition des patients selon le sexe

5. L'étude de la résistance de *K. pneumoniae* aux β -lactamines

Toutes les souches de *K. pneumoniae* ont été testées vis-à-vis 9 molécules d'antibiotiques appartenant la famille des β -lactamines (fig.16). A partir des résultats obtenus, 57.14% d'elles ont été résistantes au CPM, la moitié des souches sont résistante à l'AMC (50%), 42.85% au CZ, 33.33% au CTX, 31% à la CAZ, 23.80% au ATM, 11.90% à ERT et

une faible résistance à FOX (4.76%) (fig.17). Les résultats d'antibiogramme des souches étudiés sont notés dans l'Annexe 3.

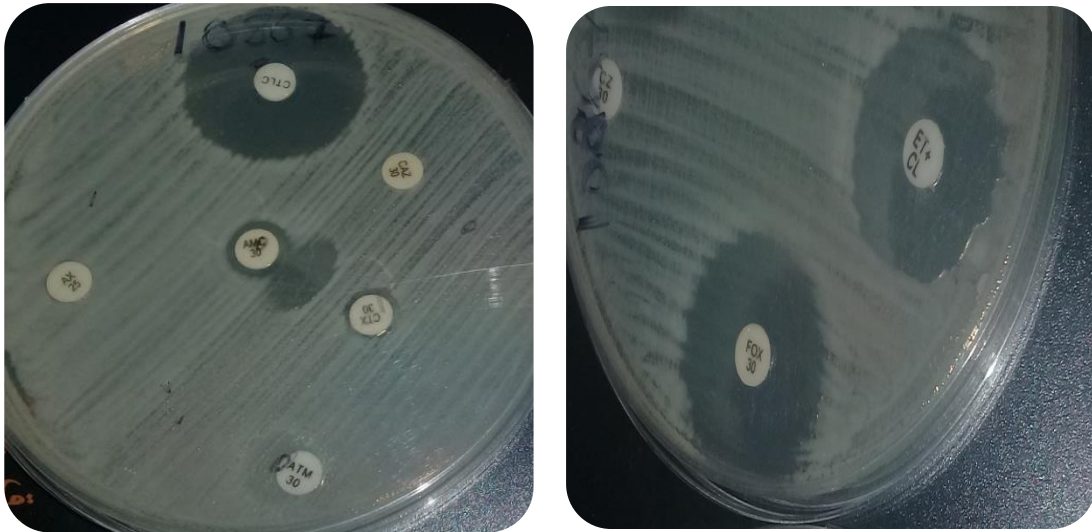


Figure 16: L'antibiogramme d'une souche de *K. pneumoniae*

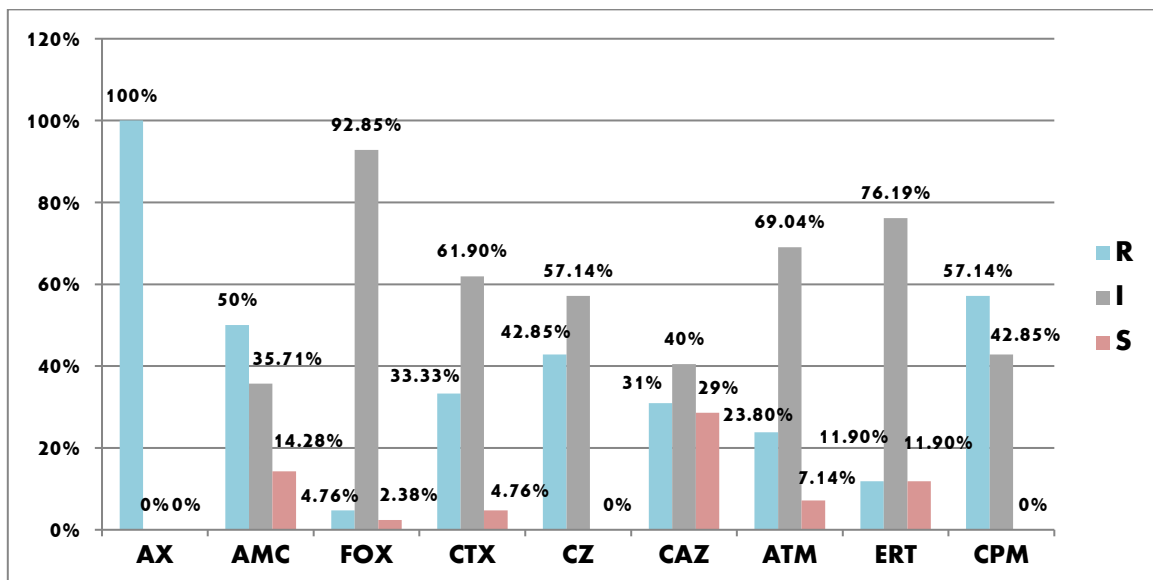


Figure 17: Profil de résistance des *K. pneumoniae* aux β -lactamines

AX: amoxicilline, AMC: amoxiciline+acide clavulanique, FOX: céfoxitine, CTX: céfotaxime, CZ: céfazoline CAZ, céftazidime, ATM: azétreoname, ERT: értapénème, CPM: céfipime

6. Analyses phénotypiques des mécanismes de résistance

6.1. Recherche phénotypique des β -lactamases à spectre étendu

La recherche de la β -lactamase à spectre étendu (BLSE) concerne les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) précisément céfotaxime (CTX). D'après les résultats d'antibiogramme, 14 isolats qui ont été résistantes vis-à-vis le CTX.

6.1.1. Test de synergie

Les résultats du test de synergie ont été positifs chez 12 souches. Ayant présenté une zone d'élargissement autours des disques en «bouchon de champagne» entre les disques AMC et CTX (fig. 18), indiquant clairement la production de BLSE par ces souches (BLSE+), et les 2 souches restant ayant test de synergie négatif.

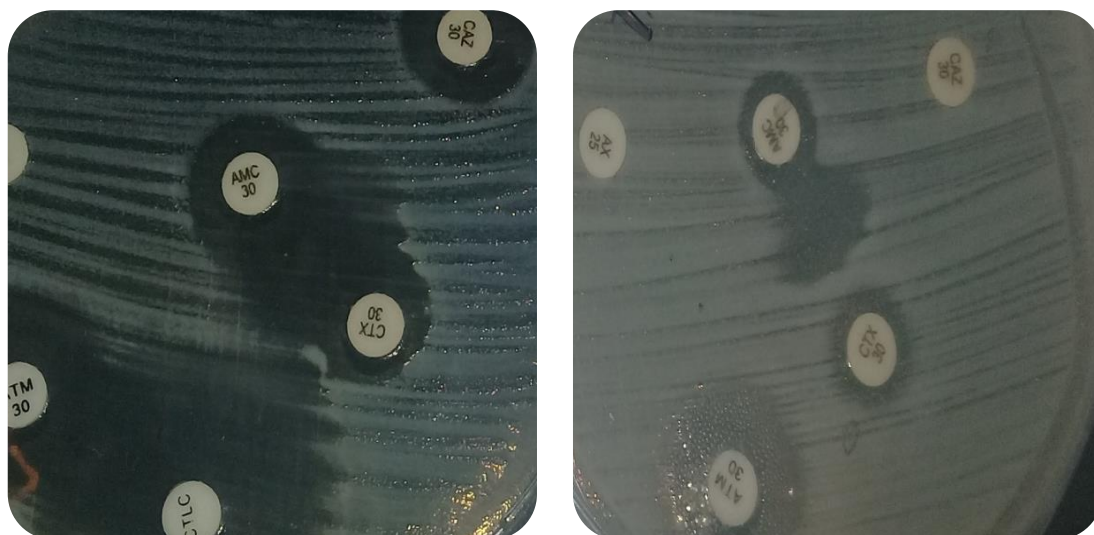


Figure 18: Test de synergie positif chez souches de *K. pneumoniae* (BLSE+)

6.1.2. Test de double disque

Le résultat du test de double disque a été positif pour les 12 souches de *K. pneumoniae* testées.



Figure 19 : Test du double disque (test positif)

6.2. La recherche phénotypique des carbapénèmases

Il faut considérer comme suspecte d'entérobactérie productrice de carbapénèmases (EPC) toute souche de sensibilité diminuée (I/R) à au moins l'un des carbapénèmes. La détection des EPC par de simples tests phénotypiques n'est pas aisée car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité.

L'értapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. (Dortet *et al.*, 2014)

6.2.1. Test de Hodge modifié (MHT)

Parmi les 5 souches de *K. pneumoniae* résistantes à l'értapénème (ERT), les 5 souches ont MHT positive, cela déterminé par l'observation d'une déformation de la zone d'inhibition entre les stries des souches testées et la culture d'*Escherichia coli* ATCC 25922. Ce qui suggère une production de carbapénémase par les souches testées (fig. 19).

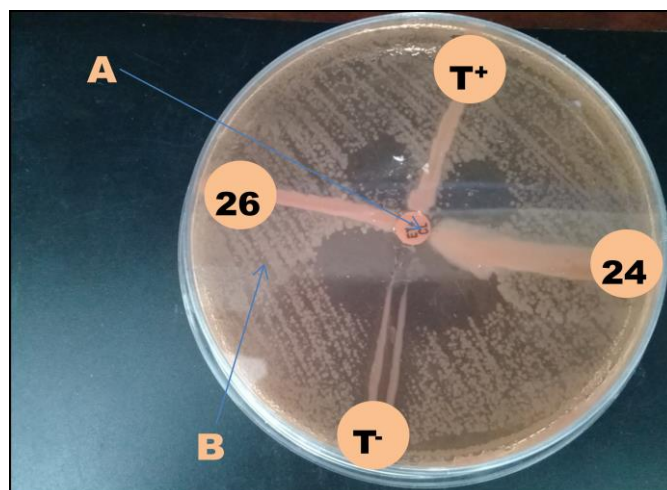


Figure 20 : Résultat du test de Hodge modifié

A: disque értapénème 10µg/ml, **B**: la souche *Escherichia coli* ATCC 25922, **T⁻**: témoin négative (*E. coli* ATCC 25922), **T⁺**: témoin positive (*K. pneumoniae* KPC), **26** et **24** : *K. pneumoniae* (souches testées), déformation de la zone d'inhibition à l'interaction entre une strie et la culture d'*E. coli* ATCC 25922.

5.2.2. Recherche de métallo-β-lactamases

Les bandelettes d'E-test IMP ont été utilisées pour les 5 souches de *K. pneumoniae* ayant présentés un diamètre réduit vis-à-vis l'értapénème (ERT). Le test était positif pour 2 souches ayant portées les codes 26 et 42, et négatif pour les 3 souches restantes.

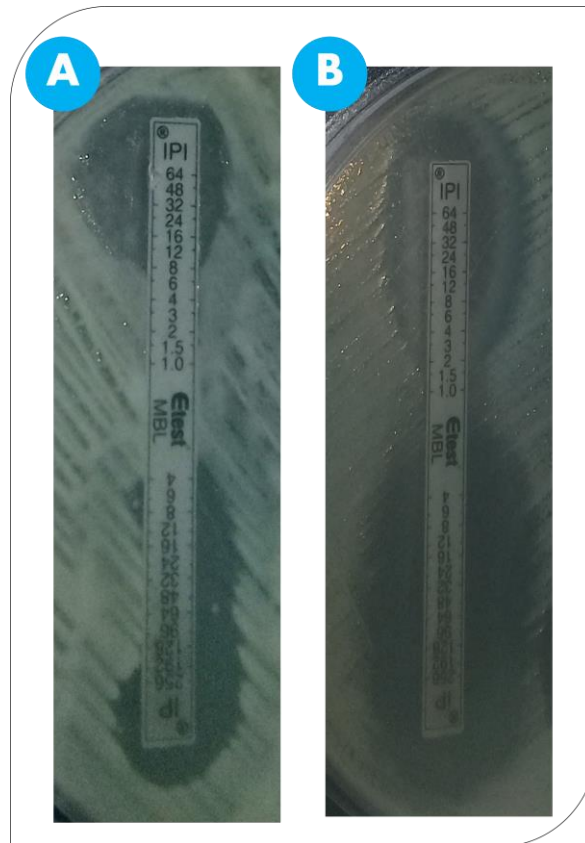


Figure 21 : Résultats d'E-test M β L

A: test positif, B: test négatif.

6.2.3. Carba-NP test modifié

Le Carba NP test modifié a été positif chez les 5 souches testées qu'ayant une résistance à l'értapénème. (fig 21.c)

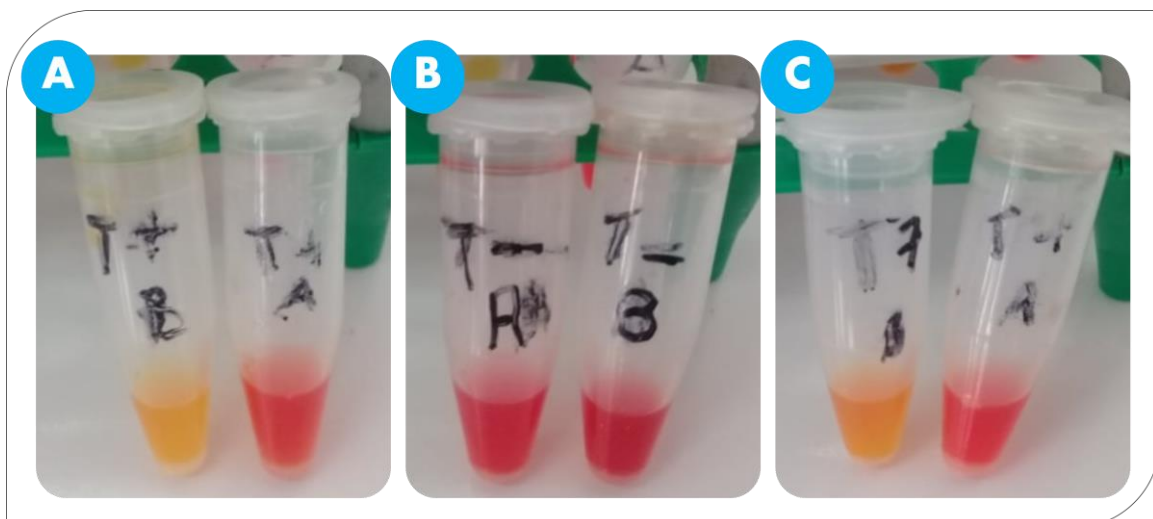


Figure 22: Carba NP test modifié

A: témoin positif, B: témoin négatif, C: test positif.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des résultats des tests phénotypiques de la recherche des carbapénèmases

N° de souche	MHT	Craba NP test	MβL
24	+	+	-
26	+	+	+
28	+	+	-
29	+	+	-
42	+	+	+

7. Répartition de *K. pneumoniae* selon les phénotypes de résistance aux β-lactamines

D'après les tests de la recherche phénotypique des mécanismes de résistance et à partir de 42 souches de *K. pneumoniae*, on a constaté 12 souches KpBLSE+ ayant présenté un taux de 28.57%. Et d'après les tests phénotypiques de la recherche de carbapénémase, on a détecté 2 souches productrices de métallob-β-lactamase (4.76%), et 3 souches productrices d'autres carbapénèmases (7.14%).

Chapitre 4

Discussion

Notre étude a porté sur 42 souches de *K. pneumoniae* uro-pathogènes isolées durant la période d'Octobre 2018 à Février 2019 à l'hôpital d'El-Hakim Saâdan de la ville de Biskra.

Dans notre travail on s'entend d'identifier les souches de *K. pneumoniae* isolées sur la base de leurs caractères biochimiques, de réaliser une enquête épidémiologique, et de déterminer les profils et les niveaux de résistance aux β -lactamines. Pour entamer dans une seconde étape, la mise en évidence des phénotypes de la résistance de ces souches vis-à-vis les β -lactamines.

Les infections urinaires sont essentiellement bactériennes. Elles sont dues à des bactéries d'origine digestive et sont généralement mono bactériennes (Raghu, 2016). D'une manière pratique, la fréquence des infections urinaires varie selon les pays, les hôpitaux et les services et reste influencée par différents facteurs de risque (Fares, 2010). D'après l'étude de Brahim en 2013 à Rabat, *Klebsiella* occupe la deuxième place dans la liste des entérobactéries isolées dans les urines. Et responsable de 6,6% d'infection urinaire nosocomiale. (Albrecht, 2015)

Dans le point de départ, l'identification présomptive des bactéries isolées a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes en cite l'Atlas de poche de microbiologie. Au cours de notre étude, nous avons trouvé que toutes les souches que nous avons analysées sont des bacilles immobiles à Gram négatif, ayant le test d'oxydase négatif et test de la catalase positif, elles fermentent le lactose, le saccharose, le glucose avec production du gaz, et sans production de l' H_2S . Utilisent le citrate comme seule source de carbone, ne possèdent pas la tryptophanase, capables de transformer l'urée en carbonate d'ammonium, utilisent le mannitol comme source de carbone et d'énergie, fermentent le glucose par la fermentation butanediolique en produisant l'acétone. Ainsi, nos résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par les auteurs précédemment cités.

Dans le présent travail, les patients externes ont été les plus touchés par les infections urinaires à *K. pneumoniae* par rapport aux malades hospitalisés.

En revanche, il est difficile de classer les infections urinaires chez les malades externes comme des infections communautaires car il convient à signaler que le laboratoire de bactériologie de l'hôpital de notre étude reçoit des prélèvements des patients de d'autres secteurs hospitaliers de la ville de Biskra (privé ou étatique) suite au manque des laboratoires de microbiologie fonctionnels dans ces derniers. Néanmoins, les malades hospitalisés dans ces hôpitaux sont considérés comme externe par rapport à l'hôpital El-Hakim Saâdan.

Egalement, on ne pouvait pas affirmer que les infections urinaires chez les malades internes sont des infections nosocomiales suite au manque de renseignement.

Le sexe et l'âge sont des facteurs de risque importants pour contracter une infection urinaire. De façon générale toutes catégories d'âges sont à risque mais les femmes sont les plus touchées par ces infections (Brahimi, 2013), dans notre étude nous n'avons pas noté de différence majeure dans la répartition des sexes, les femmes 23 cas, et les hommes 19 cas. Ceci a également été retrouvé dans plusieurs études à l'échelle nationales et internationales, à Constantine par Arafa *et al* (2009), à Annaba par Belbel (2013). Au Maroc Moukrad *et al* (2012) et Benhiba *et al* (2015), de même par Seija *et al* (2010) en Espagne.

En effet, le taux journalier d'acquisition de la bactériurie est deux fois plus élevé chez la femme que chez l'homme (Fares, 2010). Cependant, cette petite prédominance est due à l'anatomie du l'urètre qui est court rendant plus facile la migration extraluminale des germes de la flore périnéale vers la vessie (Mrich, 2018). D'autre part, les infections sont élevées chez la femme à cause de d'autres facteurs comme la modification de l'acidité vaginale par la diminution normale des hormones, la sécrétion vaginale après la ménopause, certain habitudes d'hygiène et la grossesse. (ELmahi, 2013)

En ce qui concerne l'âge, la fréquence des infections urinaires augmente avec l'âge et deux périodes sont plus propices: en début d'activité sexuelle et en période post ménopausique (Brahimi, 2013). De notre côté, la catégorie entre 25 et 64 ans, a été la plus touchée par les infections urinaires à *K. pneumoniae*, nos résultats concordent avec les résultats de Bentroki *et al* en 2012 à Guelma qui ont constaté 75% des infections urinaires chez les adultes, aussi avec l'étude de Savadogo *et al* en 2017 à Paris, où la moyenne d'âge des malades ayant une infection urinaire par les entérobactéries était 55 ans.

Comme nous l'avons mentionné, chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux β -lactamines.

En effet, la résistance des souches dans une espèce varie non seulement avec le temps, le lieu géographique, le service dans un même hôpital et le produit pathologique, mais également avec les antécédents des patients par exemple antibiothérapie, hospitalisation, récidivité ou pathologie chronique. (Fares, 2010)

D'après l'analyse des nos résultats de l'antibiogramme et comparativement avec d'autres études, 50% de nos souches sont résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC), ce résultat est très proche à celle de Sekhri-Arafa qui a révélé un taux de 43,35%. Tandis que Souna a détecté une forte résistance à l'AMC d'un pourcentage de 90%. Alors que 100% des souches ont l'été dans l'étude de Bouguenoun (2017).

Notre résultat de la résistance à la céfoxitine (FOX) exprime un taux faible (4.76%), ce résultat est inférieur relativement au résultat montré par Belbel en 2013 à Annaba (10%), Bouguenoun en 2017 à Guelma (13%). En revanche les souches restent à 100% sensibles à la FOX selon Sekhri-Arafa à Constantine, et Marbough (2016) à Rabat.

La résistance à la céfazoline (CZ), montré un taux de résistance de 42.85%, de même a été retrouvé par Bontroki *et al* (2012). D'autre part les résultats d'étude de Sekhri-Arafa en 2011 à Constantine (73,07%) et Belbel à Annaba (91%) sont supérieurs par rapport à cette étude.

La résistance de notre série de souche à la céfotaxime (CTX) a présenté un taux de 33.33%, notre résultat est inférieur de Sekhri-Arafa à Constantine (61,76%), de Souna (2010) à Sidi Bel Abbes (80%) et de Bouguenoun (2017) à Guelma (91%).

Concernant la résistance, à la céftazidime (CAZ), on a constaté environ 31% des souches résistantes. Notre résultat reste dans le cadre de Moukrad *et al* (2012). Alors que Souna (2010) a été révélé un taux très important (80%). Tandis que les klebsielles restent 100% sensibles à la CAZ selon Marbough (2016).

Pour l'Aztréonam (ATM), on a détecté 23.80% des souches résistantes, notre résultat se diffère au résultat de Souna, où elle a été trouvée 73.3% des souches résistantes à l'ATM, Bouguenoun à Guelma (78%). Alors qu'en 2016 à Rabat toutes les souches testées ont été à 100% sensibles.

En ce qui concerne la résistance des nos souches au Céfépime (CPM), un taux de 57.14% a été révélé, ce résultat est inférieur à celui de Souna (2010) à Sidi Bel Abbes (80%) et de Labid (2014) à Annaba (83.3%).

Le taux de résistance acquise à l'ertapénème (ERT) de nos souches étudiées est de 11.90%, ce résultat concorde avec celui de Bouguenoun (2017) à Guelma et de Moukrad *et al* (2012) au Maroc. Alors que la totalité des souches de Marbough (2016) à Rabat, restent sensibles à l'ERT.

On note alors primitivement que les antibiotiques les plus actifs contre les souches étudiées dans ce travail sont essentiellement la céfoxitine, alors que l'émergence des souches résistantes l'ertapénème reste très inquiétante malgré le faible taux.

La diffusion des clones résistant aux C3G ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ce qui pose un grand problème au niveau des hôpitaux algériens et dans le monde entier (Bouguenoun, 2017). Le pourcentage de *K. pneumoniae* productrices de BLSE augmente progressivement depuis le début des années 2000 (Desert, 2017).

Dans notre étude, on a réalisé des tests phénotypiques pour la recherche des BLSE (test de synergie et doubles disques) chez 14 souches ayant présenté une résistance aux CTX, 12 souches (voir un taux de 28.57% sur les 42 isolats) ont révélé un phénotype KpBLSE+. Notre résultat concorde avec le résultat de Lagha en 2015 qui a mis en évidence 30% de KpBLSE+ isolées de l'hôpital de Laghouat à partir des prélèvements cliniques, et avec le résultat de Moukrad *et al.*, 2012 au Maroc qui a mis en évidence 31.4% de KpBLSE+. Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés en 2007, au CHU Benbadis de Constantine où la fréquence d'isolement des souches KpBLSE+ isolée à partir des urines était de 14.28% (Sekhri-Arafa, 2011), ces études en Algérie sont très proches à ceux trouvés au Maroc d'après Ameziane (2016), et au Togo par Toudji *et al* (2017).

Cependant, deux souches n'ont pas présenté des tests positifs (KpBLSE-) malgré leur résistance au CTX, cela peut être expliqué par la production d'une céphalosporinase à haut niveau (AmpC) ou aux mécanismes non enzymatiques (Bouguenoun, 2017).

Cependant, la restriction de l'utilisation des C3G peut être perçue comme une «fausse bonne solution». En effet, cette restriction entraînerait une augmentation de l'utilisation de carbapénèmes, molécules de dernier recours, efficaces pour traiter les infections à BLSE qui par conséquent pourrait favoriser l'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes (aussi appelées bactéries hautement résistantes aux antibiotiques) déjà reportés dans plusieurs pays (Ndir, 2015).

Dans ce contexte, des recherches phénotypiques ont révélé des souches *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase, Parmi les tests; la version modifiée du test de Hodge. Dans notre étude on a révélé, 5 souches productrices de carbapénémase (environ 12%). La production des carbapénémases par *K. pneumoniae* a été détectée aussi par le MHT dans l'étude de Bouguenoun en 2017 pour 3 souches cliniques, pareil en 2017 au Maroc par Sbiti *et al* qui ont suspecté une production de carbapénémase chez 16 souches de *K. pneumoniae*.

Cependant, le MHT manque de spécificité (nombreux faux positifs) mais également de sensibilité (faux négatifs fréquents avec certains types d'enzyme, et en particulier les carbapénémases de type NDM) (Poirel *et al.*, 2013). Devant le manque de spécificité de MHT, les souches ont été testé par une autre technique : MCNPT (le Carba NP test modifié); une technique biochimique permettant la détection rapide des carbapénémases (Amhal, 2017). Dans notre étude, les souches ayant présentées un MHT positif ont également révélé un MCNPT positif. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Bouguenoun à Guelma.

En effet, on a utilisé le E-test MBL pour la détection spécifique des souches productrices de métallo- β -lactamases pour les 5 isolats de *K. pneumoniae* ayant présentés un

diamètre réduit vis-à-vis des carbapénèmes (értapénème) avec un MHT et MCNPT positifs, dont deux ont présenté un phénotype KpMBL+ (4.76% sur 42 isolats). On peut suggérer que les trois souches restantes sont productrices de d'autres types de carbapénémases (OXA ou KPC).

En effet, les choix thérapeutiques contre infections urinaires due à *K. pneumoniae* multi-résistantes restent difficiles et limités. Pour éviter ces épidémies, il faut procéder à des surveillances strictes de la résistance et de la consommation des antibiotiques à l'hôpital. (Labid, 2014)

Cependant, la restriction de l'utilisation des antibiotiques ne serait pas une mesure suffisamment efficace pour réduire la fréquence des infections à BLSE, puisque les antibiotiques sont en vente libre à bas prix dans les marchés parallèles exposant ainsi les populations à des antibiotiques contrefaits. De ce fait, réduire la durée de prescription empirique des C3G serait une meilleure solution que leur restriction de manière drastique. (Ndir, 2015)

Ainsi, un traitement efficace doit être sélectionné en fonction de l'antibiogramme afin de limiter l'utilisation des carbapénèmes lorsque cela est possible. En effet, la classe des carbapénèmes est le traitement de premier choix pour traiter les bactéries productrices des enzymes BLSE parce que ces enzymes ne l'hydrolysent pas. (Belbel, 2013)

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

K. pneumoniae permet les entérobactéries les plus retrouvées dans des infections urinaires. Ces germes ont tendance à acquérir des capacités à produire divers mécanismes de résistance aux antibiotiques.

D'après certaines études, dans le premier temps les Klebsielles ont été traitées en utilisant des céphalosporines de troisième génération, puis, suite à l'apparition de résistance à ces derniers, on les a traitées par l'utilisation des carbapénèmes. Mais, l'émergence et la dissémination de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes posent des véritables échecs thérapeutiques, qui ont causées un problème majeur et mondialement répandu de santé publique. A la lumière des travaux réalisés sur la résistance bactérienne aux antibiotiques, nous avons constaté que cette situation est en pleine évolution en Algérie et dans le monde entier.

Notre présente étude est effectuée sur 42 souches de *K. pneumoniae* isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital EL-Hakim Saâdan de la ville de Biskra, qui nous a permis d'évaluer l'émergence de *K. pneumoniae* responsable uro-pathogènes et le taux de résistance des isolats aux β -lactamines.

Dans notre travail l'identification biochimique est révélée à l'aide de la galerie classique, qui a montré, distinctement, les caractères biochimiques de *K. pneumoniae*: oxydase(-), catalase (+), glucose (+), H₂S (-), gaz (+), mannitol (+), citrate (+), Uréase (+), Indole (-) et TDA (-).

Il en ressort que dans notre étude nous n'avons pas notées de différence majeure dans la répartition des sexes, les femmes sont exposées aux infections urinaires avec 55%, tandis que les hommes 45%. Et que les adultes entre 25 et 64 ans sont la catégorie la plus touchée par ces infections.

L'antibiogramme des souches isolées de *K. pneumoniae* a démontré un taux de résistance inquiétant, dont la moitié des souches ont été résistantes à l'amoxicilline+Acide clavulanique (AMC), un taux de 42.85% pour la céfazoline (CZ), 33.33% et 31% pour la Céfotaxime (CTX) et la céftazidime (CAZ) respectivement, 57.14% d'elles ont été résistantes au CPM, 23.80% vis-à-vis d'azétreoname (ATM), et un taux faible mais remarquable de résistance à l'értapénème (ERT: 11.90%) vu la rareté de ce phénotype en Algérie et la menace de la dissémination de cette résistance dans le monde.

Cependant, nous avons révélé phénotypiquement la production de BLSE chez 12 souches (28.57%), ainsi que 05 souches productrices de carbapénamase, dont 2 parmi elles, ont présenté le phénotype de production de métallo- β -lactamase.

Enfin, cette étude attire l'attention sur le risque d'une émergence importante de *K. pneumoniae* multi-résistante aux β -lactamines.

En perspective, les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par:

Des études sélectionnant une plus grande série des isolats pour donner une large échelle épidémiologique des souches;

L'utilisation des outils de biologie moléculaire et des logiciels de bioinformatique pour permettre la caractérisation des gènes de résistance et les types de résistances enzymatiques;

Enfin, au point de vue perspective, nous insistons sur l'élaboration d'une approche plus fiable pour permettre aux laboratoires de santé de renforcer la surveillance qui doit être continue et systématique.

Une meilleure maîtrise de l'hygiène hospitalière et un meilleur contrôle de la consommation d'antibiotiques au sein de l'établissement seraient toutefois des facteurs favorisant une meilleure maîtrise des risques.

Bibliographie

Bibliographie

A

Abid F., Nafissa B., Mazouz D., & Noureddine B. 2007. *Klebsiella Pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba, Algérie. *Scientific study & research*, 8(2):199-214

Achkour Z. 2012. Emergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V, Rabat, 60p.

Adda T. R. 2017. Détection des bactéries productrices de carbapénémases: Mise au point du Carba NP Test et comparaison au Test de Hodge modifié. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V, Rabat, 85p.

Albercht A. 2015. Les infections nosocomiales d'origine bactériennes, ce que doit savoir le pharmacien d'officine. Thèse de doctorat d'état, université de Lorraine, 114p.

Ameziane A. 2016. Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de BLSE uropathogènes au sein de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès durant l'année 2015. Thèse de doctorat d'état, université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc, 150p.

Amhal F.Z. 2017. Profil épidémiologique actuel des bactéries multirésistantes : Expérience de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech, Thèse de doctorat d'état, université de médecine Cadi Ayyad, Marrakech, 113p.

Arafa N., Smati F., Scheftel J. M., & Meunier O. 2009. Caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* isolées à l'hôpital universitaire de Constantine, Algérie. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies* 30:43-49.

B

Balouki M. 2017. Les bactéries multirésistantes: Evolution dans le temps et dans l'espace. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V, Rabat, 217p.

Belbel Z. 2013. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar, Annaba, 146p.

Benhiba I., Bouzekraoui T., & Zahidi J. 2015. Epidémiologie et antibio-résistance des infections urinaires à entérobactéries chez l'adulte dans le CHU de Marrakech et implication thérapeutique. *Revue Africaine d'Urologie et d'Andrologie* 1(4):166-171

Benlahsen S. 2018. Acquisition bactérienne des gènes de résistance aux antibiotiques. Thèse de doctorat d'état, université de Mohammed V, Rabat, 116p.

Bentroki A. A., Gouri A., Yakhlef A., Touaref A., Gueroudj A., & Bensouilah T.2012. Résistance aux antibiotiques de souches isolées d'infections urinaires communautaires entre 2007 et 2011 à Guelma (Algérie). In *Annales de biologie clinique* 70(6):666-668

Bouguenoun W.2017. Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar, Annaba, 170p.

Boutal H.2017. Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques. Thèse de doctorat d'état, université Paris-Saclay, Paris, 243p.

Brahimi L.2013. Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V-souissi, Maroc, 96p.

C

Chevet K., Guyot K., Mellon G., Vidal B., Couzigou C., Misset B., ... & Nguyen Van J. C.2012. Détection phénotypique d'une carbapénémase associée à une bêta-lactamase à spectre élargi chez *Klebsiella pneumoniae*. *Médecine et maladies infectieuses* 42(1):33-35

D

Desert J.2017. Prise en charge des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte dans la région dieppoise.

Dortet L., Poirel L., & Nordmann P.2013. Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénémases. *Feuillets de Biologie*, 312.

Dortet L., Cuzon G., & Nordmann P. P.2014. Note technique: Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase.

E

Elmahi F.2013. Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases diagnostiquées au laboratoire de microbiologie du chu de rabat. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V-Souissi, Rabat, 113p.

Émile C. 2008. Modalités de détection des BLSE chez les entérobactéries. *OptionBio*.19:18

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.2017/2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.Version 2.0. EUCAST 2018.

F

Fares H. 2010. Infections urinaires nosocomiales: Facteurs de risque et antibiorésistance des bactéries isolées. Etude prospective à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V de Rabat. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V, Rabat, 108p.

G

George M. G., Julia A. B., & Timothy G. L. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. In Volume 2: The Proteobacteria (pp. 735-769), Berlin, p

Ghourri M., Zidane L., & Douira A. 2014. La phytothérapie et les infections urinaires (La pyélonéphrite et la cystite) au Sahara Marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*:20(3)3171-3193.

Ghita Y. 2013. Les entérobactéries productrices de carbapénèmases: étude prospective. université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc, 49p

H

Hadaq S. 2016. Profil de résistance des bactéries aux antibiotiques en milieu extra hospitalier dans la ville de Sale. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V, Rabat, 97p.

Hirsch E. B., & Tam V. H. 2010. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(6):1119-1125

I

Illiaquer M. 2010. Épidémiologie et caractérisation moléculaire de souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au CHU de Nantes. Thèse de doctorat d'état, université de Nantes, France, 123p.

J

Joly B., & Reynaud A. 2003. Entérobactéries: systématiques et méthodes d'analyses. Techniques et Documentation, Paris, p356.

K

Kassis-Chikhani N. 2012. *Klebsiella pneumoniae* pathogène nosocomial, résistance et virulence. Thèse de doctorat d'état, université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Paris, 190p.

L

Labid A. 2014. Etude fréquentielle des bactéries responsables des infections septicémiques chez les enfants dans la région d'Annaba. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar, Annaba, 157p.

Lagha N. E. B. 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de doctorat d'état, université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, 84p.

Lecour A. 2017. Détection des carbapénèmases chez les entérobactéries. Thèse de doctorat d'état, université Toulouse III Paul Sabatier, Paris, 140p.

Leulmi Z. K. 2015. Les Proteus incriminés dans les infections communautaires et hospitalières: étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques. Thèse de doctorat d'état, université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, 227p.

Liazid A. 2014. Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen. Thèse de magister, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 95p.

M

Maleck V. 2014. Détermination de nouvelles modalités d'utilisation des bêta-lactamines en médecine vétérinaire par des approches PK/PD en vue de la protection de la santé publique: implication de la taille de la charge bactérienne pathogène. Thèse de doctorat d'état, université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, 238p.

Marbough N. 2016. Les infections urinaires chez l'enfant à l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V de Rabat. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed V, Rabat, 107p.

Meziani M. 2012. Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques: Cas des entérobactéries et *pseudomonas*. Thèse de magister, université Mentouri, Constantine, 67 pages.

Mrich H. 2018. Profil de l'antibio-résistance de l'infection urinaire nosocomiale en urologie expérience du service d'urologie CHU Mohammed VI. Thèse de doctorat d'état, université Cadi Ayyad, Marrakch, 111p.

Moukrad N., Filali F. R., & Makoudi Y. 2012. Prévalence de la multi-résistance bactérienne aux antibiotiques des infections urinaires dans la ville de Meknès (Maroc) et son évolution dans le temps. Sciences Lib ED. Mercenne 4(121105): 2111-4706

N

Ndir A. 2015. Epidémiologie et impact médico-économique des infections hospitalières causées par les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu au Sénégal. Thèse de doctorat d'état, université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 135p.

O

Ouattara Z. D. 2013. Profil antibiologique de cinq (5) principaux germes isolés dans 250 échantillons d'urines au laboratoire biotech de Bamako. Thèse de doctorat d'état, université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako, 82p.

P

Poirel L., Dortet L., & Nordmann P. 2013. Diagnostic des carbapénémases: détection et caractérisation. *La Lettre de l'infectiologue* 28(4):128-132.

Q

Qachaou A. 2011. Entérobactéries productrice des bêta-lactamase à spectre élargi: épidémiologie et profil de résistance. Thèse de doctorat d'état, université de Mohammed V, Rabat, 54p.

R

Raghu F. 2016. Épidémiologie de la résistance chez les entérobactéries isolées sur les ECBU réalisés dans un service d'urgence. Thèse de doctorat d'état, université de Paris Diderot-Paris 7, Paris, 81p.

Rahal K., Belouni R., & Benslimani A. 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS*. 4^{ème} édition, Algérie, p.46-52.

Rahal K., Belouni R., & Benslimani A. 2011. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). *Rec de L'OMS*. 6^{ème} édition, Algérie, p.

Reiner K. 2010. Catalase test protocol. American Society For Microbiology, ASM MicrobeLibrary.

Riethmuller J. 2013. La résistance des entérobactéries aux carbapénémases: étude prospective aux hôpitaux civils de Colmar du dépistage avec un milieu sélectif et intérêt de la spectrométrie de masse MALD-TOF pour le criblage. Thèse de doctorat d'état, université de Strasbourg, 160p.

Rodriguez-Villalobos H., & Struelens M. J. 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation* 15(3):205-213

S

Saghir S. 2018. Evaluation de la prise en charge des infections urinaires dans les établissements de sante prive: en médecine générale et en officine a la ville de Tanger. Thèse de doctorat d'état, université de Mohammed V, Rabat, 98p.

Saha M. R., & Jhora S. T. 2018. Detection of extended spectrum beta-lactamase producing Gram-negative organisms: hospital prevalence and comparison of double disc synergy and E-test methods. *IMC Journal of Medical Science* 12(1):32-36.

Savadogo M., Pialoux G., Bellaud G., Bourguignon A. D., Mousseaux C., & Canestri A. 2017. Profils épidémiologiques cliniques et bactériologiques des infections du tractus urinaire dans le service des maladies infectieuses et tropicales de l'hôpital Tenon de Paris: «étude préliminaire». *Revue Malienne d'Infectiologie et de Microbiologie* 10:19.

Sbiti M., Chegri M., Lahmadi K., & Louzil H. 2017. Détection phénotypique des carbapénèmases chez *Klebsiella pneumoniae* dans les isolats cliniques au Maroc. *International Journal of Advanced Research*. 5(5):1823-1830

Schembri M. A., Blom J., Krogfelt K. A., & Klemm P. 2005. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* 73(8): 4626-4633.

Sefraoui I. E. K. 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de doctorat d'état, université de Abou Bekr Blekaid, Tlemcen, 78p.

Sekhri-Arafa N. 2011. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine, 187p.

Seija V., Frantchez V., Pintos M., Bataglino M. N., Torales M., Díaz Á., & Dufrechou C. 2010. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. *Revista Médica del Uruguay* 26(1):14-24.

Solbi, S. 2013. Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilités aux antibiotiques. Thèse de doctorat d'état, université de Mohammed V-Souissi, Rabat, 79p.

Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale. 2014, 7^{ème} édition. Disponible sur [http://www. Sante.dz/aarn/index/htm](http://www.Sante.dz/aarn/index/htm)

Souna, D. 2010. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbas. Thèse de doctorat d'état, université d'Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 126p.

T

Thirion D. J., & Williamson D. 2003. Les infections urinaires: une approche clinique. *Pharmactuel* 36(5).

Traore M. A. K. 2009. Evaluation de l'efficacité d'amoxicilline + acide clavulanique dans les infections de l'arbre urinaire dans le service d'urologie du C.H.U Gabriel Toure. Thèse de doctorat, université de Bamako, 89p.

Toudji A. G., Djeri B., Karou S. D., Tigossou S., Ameyapoh Y., & De Souza C. 2017. Prévalence des souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi isolées au Togo et de leur sensibilité aux antibiotiques. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 11(3):1165-1177.

V

Vorkaufers S. 2011. Les infections urinaires communautaires bactériennes de l'adulte: prise en charge diagnostique et thérapeutique. Résultats de deux tours d'un audit clinique réalisé par 66 médecins généralistes lorrains. Thèse de doctorat d'état, UHP-Université Henri Poincaré, Nancy, 102p.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Coloration de Gram

1. On réalise un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne.

2. La fixation du frottis, on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.

3. La coloration au violet de Gentiane, la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.

4. Mordançage au lugol, étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

6. Décoloration à l'alcool, verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

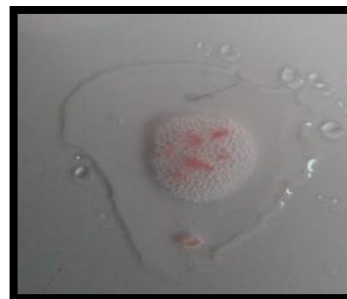
7. Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine, laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée.

8. Les bactéries Gram- sont colorées en rose. (Benlahsen, 2018)

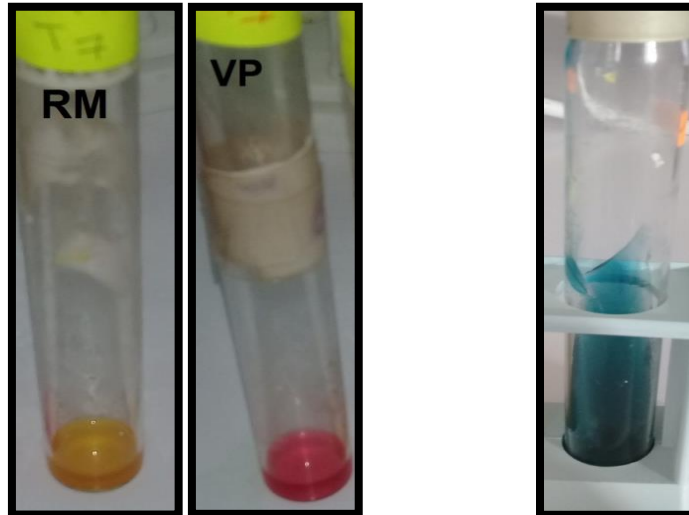
Annexe 2: Figures présentatifs des résultats de la galerie classique



Test d'oxydase

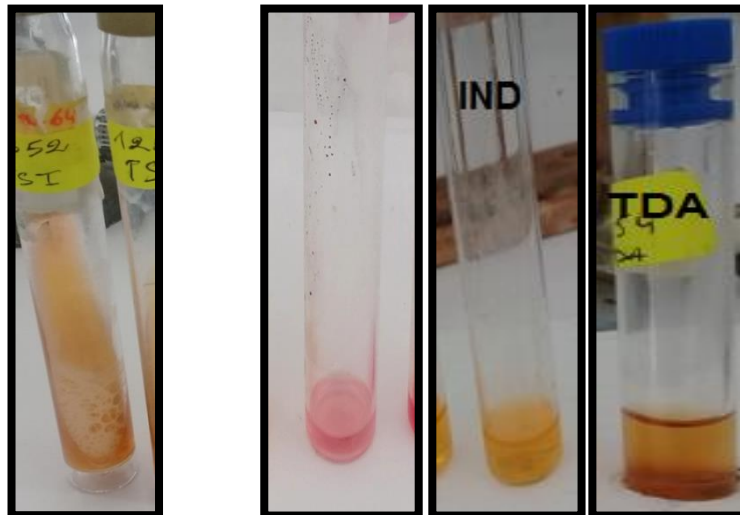


Test catalase



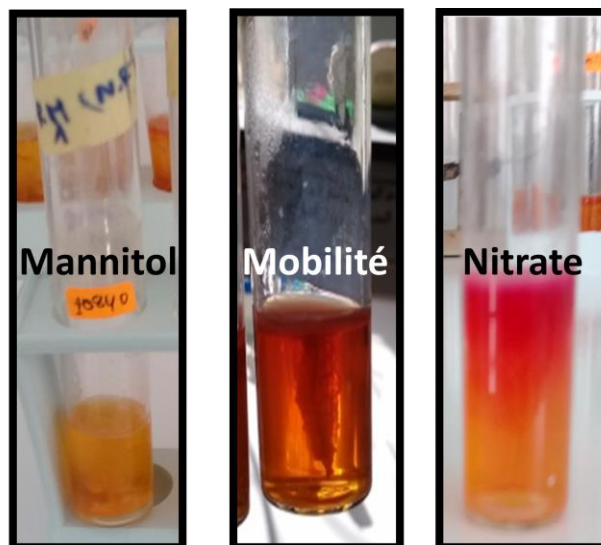
Test VP et RM

Test de citrate de Simmons



Test TSI

Test urée-indole



Mannitol-mobilité-nitrate

Annexe 3 : Résultats d'antibiogramme

N° de souche	Antibiogramme									
	AX	AMC	FOX	ATM	CTX	CAZ	CZ	ET	CTLC	CPM
1	10/R	22/S	25/S	35/S	34/S	22/S	26/S	29/S	35	9/R
2	6/R	8/R	22/S	23/S	20/R	19/I	12/R	26/S	28	29/S
3	9/R	20/S	22/S	30/S	30/S	23/ S	21/S	26/S	33	26/S
4	6/R	15/I	24/S	34/S	30/S	18/I	19/S	31/S	36	21/R
5	6/R	15/I	22/S	20/I	9/R	6/R	6/R	26/S	28	15/R
6	8/R	22/S	25/S	32/S	32/S	24/ S	23/S	29/S	35	24/S
7	6/R	15/I	25/S	17/R	13/R	25/S	6/R	22/S	29	6/R
8	9/R	11/R	27/S	16/R	9/R	26/S	22/S	27/S	30	6/R
8	6/R	11/R	25/S	12/R	6/R	24/S	6/R	23/S	28	24/S
10	7/R	9/R	20/S	29/S	27/S	28/S	10/R	26/S	30	19/R
11	7/R	17/I	23/S	30/S	30/S	25/S	20/S	27/S	31	23/S
12	6/R	8/R	19/S	6/R	7/R	18/I	6/R	23/S	27	7/R
13	6/R	19/S	22/S	31/S	29/S	11/R	22/S	21/I	32	25/S
14	6/R	10/R	24/S	16/R	9/R	26/S	6/R	25/S	29	18/R
15	6/R	13/R	24/S	19/I	8/R	20/I	6/R	19/I	25	10/R
16	8/R	19/S	24/S	32/S	30/S	27/S	21/S	25/S	33	22/S
17	9/R	20/S	29/S	30/S	28/S	20/I	20/S	29/S	29	24/S
18	6/R	12/R	25/S	19/I	7/R	20/I	6/R	25/S	29	9/R
19	6/R	15/I	22/S	28/S	27/S	27/S	20/S	26/S	29	21/R
20	6/R	19/S	21/S	32/S	31/S	26/S	24/S	27/S	32	24/S
21	9/R	23/S	19/S	32/S	30/S	12/R	22/S	29/S	34	22/S

22	10/R	15/I	23/S	29/S	29/S	8/R	20/S	25/S	30	23/S
23	6/R	8/R	21/S	26/S	28/S	8/R	13/R	30/S	33	24/S
24	6/R	6/R	21/S	27/S	24/I	27/S	10/R	13/R	23	18/R
25	9/R	6/R	24/S	30/S	28/S	13/R	19/S	26/S	32	22/S
26	6/R	6/R	16/I	6/R	13/R	20/I	6/R	12/R	21	6/R
27	11/R	21/S	23/S	30/S	29/S	23/S	20/S	23/S	33	25/S
28	6/R	6/R	23/S	34/S	25/I	19/I	11/R	14/R	28	19/R
29	6/R	6/R	6/R	8/R	6/R	6/R	6/R	7/R	12	6/R
30	9/R	21/S	25/S	31/S	30/S	29/I	21/S	24/S	32	6/R
31	12/R	23/S	26/S	31/S	30/S	14/R	23/S	29/S	35	23/S
32	6/R	11/R	21/S	32/S	30/S	18/I	17/S	27/S	34	21/R
33	11/R	22/S	22/S	33/S	31/S	19/I	19/S	22/S	33	25/S
34	7/R	28/S	22/S	25/S	26/S	25/S	19/S	20/I	27	24/S
35	6/R	6/R	22/S	6/R	6/R	26/S	6/R	19/I	21	6/R
36	12/R	19/S	25/S	27/S	27/S	26/S	21/S	27/S	29	25/S
37	6/R	6/R	8/R	12/R	6/R	6/R	6/R	21/I	25	9/R
38	7/R	19/S	24/S	30/S	32/S	19/I	23/S	28/S	34	20/R
39	6/R	8/R	24/S	10/R	6/R	6/R	6/R	24/S	24	6/R
40	6/R	13/R	23/S	31/S	30/S	6/R	19/S	28/S	35	20/R
41	6/R	9/R	24/S	30/S	29/S	6/R	19/S	28/S	29	21/R
42	6/R	6/R	19/S	30/S	28/S	6/R	13/R	14/R	30	16/R

المخلص

في دراستنا كنا مهتمين بجمع وتحديد 42 سلالة من نوع *K. pneumoniae* المسببة لأمراض الجهاز البولي مستخلصة من عينات لمرضى في مستشفى الحكيم سعدان- بسكرة. وهذا لتحديد و تقييم مدى ظهور مقاومتها. وكنا مهتمين أيضا بتحديد مظاهر مقاومتها ضد هذه الأخيرة. وفي هذا السياق قمنا بالتعرف على خصائص *K. pneumoniae* عن طريق اختبارات التوجيه و اختبارات الكيمياء الحيوية و التي أكدت الخصائص التالية : OXY(-), CAT(+), MH (-) et TDA (-) دراسة المقاومة لـ β -lactamines بواسطة طريقة الإنتشار في الوسط GLU(+), H₂S(-), gaz(+), CIT(+), URE(+), IND(-) التي بينت ظهور مقاومة لـ CPM(57.14%)، AMC(50%)، CZ(42.85%)، CTX(33.33%)، CAZ(31%)، ATM(23.80%)، ERT(11.90%)، FOX(4.76%). و أخيرا دراسة آليات المقاومة بواسطة اختبار التآزر و اختبار مزدوج الأقراص حيث كانا اجابيين لـ 12 سلالة *K. pneumoniae* منتجة β -lactamines (ذات المجال الواسع 28.57%). و اختبار MHT, MCNPT و MBL التي كشفت عن 05 سلالات (11.90%) المنتجة carbapénèmases، وبالتحديد سلالتين (4.76%) منتجتين metallo- β -lactamase. مجملا، نتائج هذه الدراسة أثبتت ظهور معتبر للمقاومة من طرف سلالات *K. pneumoniae* ضد أغلب β -lactamines.

الكلمات المفتاحية : *K. pneumoniae*, مقاومة, β -lactamines, أنزيم, metallo- β -lactamase , carbapénèmases.

Résumés

Dans notre étude nous nous sommes intéressées à collecter et identifier 42 souches de *Klebsiella pneumoniae* uro-pathogènes à l'hôpital EL-Hakim Saâdan de Biskra. Afin d'évaluer l'émergence des souches résistantes aux des β -lactamines ainsi que de déterminer leurs mécanismes phénotypiques de résistance aux ces derniers. Dans ce contexte on a opté pour: La détermination des caractères de *K. pneumoniae* par les tests d'orientations et les tests biochimiques qui nous ont confirmé les caractères suivants: OXY(-), CAT(+), GLU(+), H₂S(-), gaz(+), CIT(+), URE(+), IND(-) et TDA (-). L'étude de la résistance aux β -lactamines par la méthode de diffusion en milieu MH qui nous a révélé l'émergence d'une résistance 57.14% au CPM, 50% à l'AMC, 42.85% au CZ, 33.33% au CTX, 31% à la CAZ, 23.80% au l'ATM, 11.90% à ERT et 4.76% à FOX. Et finalement une étude phénotypique des mécanismes de résistance par les tests de synergie et de doubles disques qui ont été positifs chez 12 souches de *K. pneumoniae* (KpBLSE+ 28.57%); et les tests MHT, MCNPT et E-test MBL qui ont révélé 05 souches (11.9%) productrices de carbapénémases et spécifiquement 02 souches (4.76%) productrices de metallo- β -lactamase. En globale, les résultats de cette étude ont montré une émergence d'une résistance importante des souches de *K. pneumoniae* à la plupart des β -lactamines.

Les mots clés: *K. pneumoniae*, résistance, β -lactamines, enzymes, carbapénémases, metallo- β -lactamase.

Abstract

In our study we were interested in collecting and identifying 42 strains of *Klebsiella pneumoniae* uro-pathogenic of patients consulted at the EL-Hakim Saâdan Hospital in Biskra. To highlight their profil and to assess their emergence of resistance to β -lactam. And we were also interested in determining their phenotypes of resistance to them. In that context we opted to: detemination of characterizes of *K. pneumoniae* by the orientation tests and the biochemical's tests witch confirmed the characters: OXY(-), CAT(+), GLU(+), H₂S(-), gas(+), CIT(+), URE(+), IND(-) and TDA (-). The study of resistance to β -lactam by the diffusion method in MH media revealed the emergence of 57.14% resistance to CPM, 50% to AMC, 42.85% to CZ, 33.33% to CTX, 31% at the CAZ, 23.80% at the ATM, 11.90% at ERT and 4.76% at FOX. And finally a phenotypic study of resistance mechanisms by synergy tests and double disks that were positive in 12 strains of *K. pneumoniae* (KpBLSE+ 28.57%); and the MHT, MCNPT and E-test MBL tests which revealed 05 strains (11.9%) producing carbapenemases and specifically 02 strains (4.76%) producing metallo- β -lactamase. Overall, the results of this study showed significant acquired resistance of *K. pneumoniae* strains to most β -lactamines.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, resistance, β -lactam, enzymes, carbapenemases, metallo- β -lactamase.