

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



N° d'ordre:

N° de Série :

Thèse

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD

En Microbiologie

Option : Biotechnologie Microbienne, Génome et Environnement

Intitulée

*Les Proteus incriminés dans les infections communautaires
et hospitalières: étude moléculaire de la résistance aux
antibiotiques*

Présenté par :

Mme LEULMI Zineb Ep. KANDOULI

Soutenue le : 05 /03/2015

Devant le jury :

Président :	Mr. BOULAHROUF A.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Directrice :	Mme. MIHOUBI I.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Co-directeur:	Mr. BENLABED K.	Pr. Univ. Rabah Bitat de Constantine
Examineurs :	Mr. KITOUNI M.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
	Mr KHELIFA F.	M.C.(A) Univ. Rabah Bitat de Constantine

Année universitaire 2014-2015

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été réalisé au sein de deux laboratoires : Laboratoire de Microbiologie de Centre Hospitalo-universitaire de Constantine, et Laboratoires de l'Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), UMR CNRS-6236, IRD189, IFR48, Faculté de Médecine et de pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

A l'issue de la rédaction de ce travail de recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes. Je commencerai donc ce document en adressant quelques remerciements.

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Madame **MIHOUBI I**, Professeur à l'Université Constantine 1, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié ses qualités humaines d'écoute et de compréhension.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à mon co-directeur de thèse, Professeur **BENLABED K.**, Chef du Laboratoire de Microbiologie au CHU de Constantine, pour son accueil dans son laboratoire dont lequel une partie de ce travail a été réalisé, pour sa disponibilité, ses idées et conseils ainsi que pour son aide précieuse de tous les jours. Ce fut un immense plaisir pour moi de travailler ces quelques années avec lui, années pendant lesquelles j'ai beaucoup appris notamment lors de mon travail expérimental qui représente la majeure partie de ma thèse.

Je considère comme un grand honneur que Monsieur **BOULAHROUF A.**, Professeur à l'Université Constantine 1, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de le présider. Je voudrais donc le remercier vivement.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury, Monsieur **KITOUNI M.** (Professeur à l'Université Constantine 1) et Monsieur **KHELIFA F.** (Maitre de conférence à l'Université Constantine 3), d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer également mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à Monsieur **ROLAIN J.M.**, Professeur à l'université d'Aix-Marseille de m'avoir accueilli et offert l'opportunité d'effectuer ce travail au sein de son équipe de recherche et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à son bon déroulement.

J'adresse un remerciement particulier à Monsieur **LAOUAR ABD EL AZIZ** (*tonton AZZOU*), surveillant médical au service de médecine interne (CHUC), pour son aide et son soutien durant toute ma formation pratique et mes stages réalisés à l'hôpital depuis la Licence jusqu'à ce jour.

Mes remerciements vont également à tous les membres des équipes de recherche des deux laboratoires dont le travail a été réalisé (URMITE et laboratoire de microbiologie de CHUC): les enseignants – chercheurs en particulier Monsieur **LEZZAR A.** pour son aide précieux, les techniciens et mes collègues doctorants pour tous les échanges techniques, scientifiques et pour leur sympathie, leur accueil chaleureux pendant ces cinq ans de thèse. Sans oublier de remercier l'ensemble du personnel de l'administration spécialement **Nadia YUCEFI** (UMC) et **Valérie FILOSA** (URMITE) pour leur accueil et leur gentillesse.

C'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je dédie cette thèse à:

Mes très chers parents

Papa Rachid

Maman Bouldjeje Mounira

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je n'aurais jamais espéré avoir de meilleurs parents. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de 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.

Je mets entre vos mains, le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être toujours avec moi. Quoique je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi.

Mon très cher mari Chouaib Kandouli

Cher mari j'aimerais bien que tu trouve dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et ta collaboration dans ce travail, ton soutien, tes encouragements pendant toute cette période de thèse et ta présence à mes côtés dans les moments de joie et de peine, ta gentillesse dont tu m'as toujours entouré et à ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour...

A Mon Très Cher Petit Poussin Bassem Abd Errahmane :

C'est à toi mon adorable ange, ma joie, mon petit trésor qui a donné un sens différent à ma vie, que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Je t'aime mon bébé et je te souhaite tous le bonheur du monde.

Mes très chers frères Abd El Hakim, Redha, Adb El Malek.

Ma très chère sœur Sihem

Veillez trouvez dans ce travail un modeste témoignage de mon amour et toute ma gratitude, de mon affection la plus sincère et de mon attachement le plus profond. Je vous souhaite une belle vie.

La mémoire de mon beau père Kandouli Ahcène

Que Dieu lui accorde son immense miséricorde

Ma belle mère Leulmi Aicha,

Mes beaux frères et mes belles sœurs : Hafid, Sofiane, Said, Zohra, Badra et Rokia.

Aucune dédicace ne saurait exprimer ma gratitude et ma fierté de faire partie de votre famille. Que ce travail soit le témoignage d'un amour profond et sincère.

Mes très chères amies

En particulier: Asma, Kaoutar, Amira, Hind et Nassima, je vous souhaite tous un avenir plein de succès, de bonheur et de santé.

*A toute ma famille, mes amies, à tous ceux qui me sont chers,
A tous ceux que j'ai omis de citer, je dédie cette thèse.*

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Revue bibliographique	
Chapitre 1 : Les antibiotiques	5
1. Mécanisme d'activité des antibiotiques	5
1.1. Les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne	6
1.2. Les antibiotiques ciblant la membrane plasmique	8
1.2.1. Les polypeptides tensio-actifs	8
1.2.2. Les polypeptides non tensio-actifs	8
1.3. Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes	8
1.4. Les antibiotiques qui ciblent l'ARN	10
1.5. Les antibiotiques qui ciblent l'ADN	10
2. Les résistances aux antibiotiques	12
2.1. Résistance aux β -lactamines	12
2.1.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique : Les β -lactamases	13
2.1.1.1. Classification de β -lactamases	13
2.1.1.2. Mode d'action des β -lactamases	15
2.1.1.3. Type de β -lactamases	16
2.1.2. Diminution de la perméabilité membranaire	23
2.1.3. Modification de la cible	23
2.1.4. Mécanisme d'efflux actif	23
2.2. Résistance aux aminosides	25
2.3. Résistance aux quinolones	28
Chapitre 2 : <i>Proteus</i>, <i>Morganella</i> et <i>Providencia</i>	30
1. Introduction	30
2. Le genre <i>Proteus</i>	32
2.1. Taxonomie et phylogénie	32
2.2. Habitat et pathogénicité	34
2.3. Facteurs de virulence	36
2.3.1. Uréase	37
2.3.2. IgA Protéase	37
2.3.3. Hémolysine	38
2.3.4. Agglutinine toxique de <i>Proteus</i>	39

2.3.5. Flagelles et essaimage	39
2.3.6. Fimbriae	41
2.4. Sensibilité aux antibiotiques	42
3. Le genre <i>Morganella</i>	44
3.1. Habitat et écologie	44
3.2. Pathogénicité	44
3.3. Facteurs de virulence	45
3.3.1. Hémolysine	45
3.3.2. Uréase	46
3.4. Sensibilité aux antibiotiques	46
4. Le genre <i>Providencia</i>	47
4.1. Taxonomie et phylogénie	47
4.2. Habitat et écologie	48
4.3. Pathogénicité	49
4.4. Facteurs de virulence	50
4.4.1. Adhérence et fimbriae	50
4.4.2. Uréase.	51
4.5. Sensibilité aux antibiotiques	51

Matériel et Méthodes

1. Cadre de l'étude et population étudiée	52
2. Types de prélèvement et leur mode de traitement spécifique	53
2.1. Prélèvements	53
2.1.1. Urine	53
2.1.2. Pus et suppurations	54
2.1.3. Hémoculture	54
2.1.4. Ponction lombaire	55
2.1.5. Ponction pleural	55
2.1.6. Ponction d'ascite	55
2.1.7. Prélèvement endotrachéal	56
2.1.8. Dispositifs de soins (sondes, cathéters et drains)	56
2.2. Transport	56
2.3. Examen macroscopique	56
2.4. Examen microscopique	56
2.4.1. Examen à l'état frais	56
2.4.2. Examen après coloration	57
3. Mise en culture et Isolement	58
4. Identification des souches isolées	58
4.1. Tests biochimiques	58
4.1.1. Méthode classique	58
4.1.2. Système API 20 E	60

4.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF	61
4.2.1. Nettoyage de la cible	62
4.2.2. Préparation de la matrice	62
4.2.3. Préparation des échantillons et analyse spectrométrique	62
4.2.4. Traitement des données avec le logiciel Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics)	63
4.2.5. Création de MSP dendrogramme	63
4.3. Identification moléculaire par séquençage de gène ADNr 16S	64
4.3.1. Préparation de l'ADN	64
4.3.2. Polymérase Chain Réaction (PCR) standard	64
4.3.3. Mise en évidence des amplifiats	65
4.3.3.1. Préparation du gel d'agarose	66
4.3.3.2. Electrophorèse des produits d'amplification	66
4.3.4. Purification de l'ADN	66
4.3.5. Séquençage	67
4.3.5.1. PCR Big Dye	67
4.3.5.2. Purification par Sephadex	69
4.3.5.3. Séquençage	69
4.3.6. Analyse des séquences	70
4.3.7. Analyses phylogénétiques des séquences et construction des arbres phylogénétiques	70
4.4. Identification moléculaire par séquençage de gène rpoB	71
5. Détermination des profils de résistance	72
5.1. Tests phénotypiques	72
5.1.1. Antibiogramme selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)	72
5.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-Test	73
5.1.3. Recherche phénotypique des Carbapénémases	74
5.1.3.1. Test de Hodge modifié	74
5.1.3.2. Test de synergie EDTA-IMP (détection des métallo- β -lactamases)	75
5.1.4. Test de synergie EDTA-IMP (détection des métallo- β -lactamases)	76
5.2. Recherche moléculaire des gènes de résistance	77
5.2.1. Recherche moléculaire des β -lactamases	77
5.2.1.1. Recherche moléculaire des BLSE	78
5.2.1.2. Recherche moléculaire des carbapénémases	78
5.2.1.2.1. Polymerase Chain Réaction (PCR) standard	79
5.2.1.2.2. Polymerase Chain Réaction (PCR) en temps réel	80
5.2.2. Recherche moléculaire des résistances associées (aminoside et quinolone)	85
5.2.2.1. Résistance aux aminosides	85

Résultats et discussion

1. Résultats de fréquences d'isolement des souches de <i>PMP</i>	87
1.1. Résultats globaux	87
1.2. Résultats selon l'espèce	87
1.3. Résultats selon le mois	88
1.4. Résultats selon l'espèce et la nature de prélèvements	89
1.5. Résultats selon l'origine	91
1.6. Résultats selon le service	92
1.7. Résultats selon le sexe	94
2. Caractérisation des méthodes d'identifications de <i>PMP</i>	97
3. Antibio-résistance des souches de <i>PMP</i>	103
3.1. Profils de résistance globale aux antibiotiques des 304 souches de <i>PMP</i> isolées durant l'année 2011	103
3.2. Profils de résistance globale aux antibiotiques des 110 souches de <i>PMP</i> sélectionnée	109
3.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test	114
4. Recherche phénotypique des Carbapénémases	116
4.1. Test de Hodge modifié	116
4.2. Test de synergie EDTA-IMP	116
5. Recherche moléculaire des gènes de résistance	117
5.1. Recherche moléculaire des gènes codant pour des BLSE	118
5.2. Recherche moléculaire des carbapénémases	125
5.2.1. Par PCR en Temps réel	125
5.2.2. Par PCR Standard	125
5.3. Recherche moléculaire des résistances associées (aminosides et quinolones)	127
5.3.1. La résistance aux aminosides	127
5.3.2. La résistance aux quinolones	132
6. Transfert de la résistance par conjugaison	139
Conclusion générale et perspectives	144
Références bibliographiques	148
Annexes	
Résumés	

Liste des abreviations

AAC	Amino-Acétyltransférases
AAD	aminoglycoside adenytransferase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AME	Aminoglycoside modifying enzyme
ANT	Nucléotidyltransférase
APH	Phosphotransférases
ARN	Acide Ribonucléique
ATF	Ambient temperature fimbriae
BET	Bromure d'éthidium
BGN	Bacilles à Gram négatif
BLSE	β -Lactamase à Spectre Etendu
C3G	Céphalosporines de troisième génération
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CHUC	Centre hospitalo-universitaire de Constantine
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration minimale inhibitrice
ECBU	Examen cyto-bactériologique des urines
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique
F	Forward
HCCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
Hly	Hémolysine
IgA	Immunoglobulin A
LCR	Liquide Céphalo-rachidien
LPS	lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MR/K	mannose-resistant/Klebsiella-like fimbriae
MR/P	Mannose-resistant/Proteus-like fimbriae
MS	Mass spectrometry
MβL	métallo-B-lactamase
NaCl	chlorure de sodium
NAF	Non-agglutinating fimbriae

NDM	New-Delhi Métallo-B-lactamase
Pb	paire de bases
PCR	polymerase chain reaction
PLP	Protéines Liant la Pénicilline
PMF	<i>P. mirabilis fimbriae</i>
PMP	<i>Proteus, Morganella et Providencia</i>
PR	Polyarthrite rhumatoïde
R	Reverse
RM	rouge de méthyle
rpm	Round per minute
rpoB	RNA polymerase β - subunit
spp.	espèce
T.S.I	Triple Sugar Iron agar
TBE	Tris-borate-EDTA
TC	transconjugant
TDA	Tryptophane désaminase
TDA	Tryptophane-désaminase
TFA	Acide TriFluorocétique
TSA	Trypticase Soja
URMITE	Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes
UTI	Urinary tract infection (infections des voies urinaires)
VP	Voges-Proskauer

Liste des figures

Figure 1.	Chronologie de découverte des antibiotiques.	5
Figure 2.	Mode d'action des antibiotiques.	6
Figure 3.	Régions fonctionnelles des quinolones.	12
Figure 4.	Mécanisme d'action des β -lactamases à sérine active.	16
Figure 5.	Les différentes familles des pompes à efflux.	24
Figure 6.	Les micrographies électroniques des espèces appartenant aux genres <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> and <i>Providencia</i> . (A, B) <i>Proteus mirabilis</i> cellule nageur; (C) <i>P. vulgaris</i> ; (D) <i>P. penneri</i> ; (E) <i>M. morganii</i> ; (F) <i>Providencia stuartii</i> and (G) <i>P. rettgeri</i> . La barre représente 200 nm.	31
Figure 7.	Facteurs de virulence produits par <i>P. mirabilis</i> (A) et les sites d'action possibles lors de l'UTI (B).	36
Figure 8.	La nature cyclique de souche de <i>P. mirabilis</i> présentant le comportement d'essaimage.	40
Figure 9.	Galerie API 20E identifiant <i>P.mirabilis</i> .	61
Figure 10.	Amorces universelles pour le séquençage de l'ADNr 16S.	70
Figure 11.	Test de Hodge modifié (<i>Klebsiella pneumoniae</i> « <i>Kpnasey</i> » : témoin positif (1); <i>Klebsiella pneumoniae</i> : témoin négatif (2) ; Souche à tester (3).	75
Figure 12.	Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®).	82
Figure 13.	Résultats globaux et répartition de différentes espèces de <i>PMP</i> isolées.	88
Figure 14.	Distribution mensuelle des isolats de <i>PMP</i> (2011).	89
Figure 15.	Répartition des espèces de <i>PMP</i> isolées en fonction des services.	93
Figure 16.	Répartition des espèces de <i>PMP</i> isolées en fonction du sexe.	95
Figure 17.	Comparaison des capacités discriminatoires de séquençage partiel du gène de l'ADNr 16S (A) et MALDI-TOF MS (B) pour les souches de <i>PMP</i> .	100
Figure 18.	Antibiogramme et CMI par E-test pour les prélèvements à double population. (A) ATB double population. (B) ATB souche sensible <i>P. mirabilis</i> . (C) ATB souche résistante <i>P. vulgaris</i> . (D) E-test <i>P. mirabilis</i> . (E) E-test <i>P.vulgaris</i> .	113
Figure 19.	CMI par E-test imipenème des souches résistantes à l'imipenème.	114

Figure 20.	CMI par E-test colistine des souches <i>P. vulgaris</i> sensible à la colistine.	115
Figure 21.	Test de Hodge négatif. (<i>Klebsiella pneumoniae</i> « Kpnasey » : témoin positif (1); <i>Klebsiella pneumoniae</i> : témoin négatif (2) ; Souche testée (3).	116
Figure 22.	Test de synergie EDTA-IMP chez une souche résistante à l'imipènème. (A) deux disques d'imipènème dont l'un avec de l'EDTA. (B) disque d'imipènème et un disque vierge avec de l'EDTA.	117
Figure 23.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla_{CTX}</i> .	121
Figure 24.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla_{TEM}</i> .	122
Figure 25.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla_{SHV}</i> .	123
Figure 26.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>bla_{PER}</i> .	124
Figure 27.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes codant pour une carbapénèmase.	125
Figure 28.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>aac(6')-Ib</i> .	129
Figure 29.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>aadA</i> .	130
Figure 30.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>ant(2'')</i> .	130
Figure 31.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>aac(3)-Ia</i> .	131
Figure 32.	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>armA</i> .	131
Figure 33.	Test de conjugaison pour la souche 38 résistante à l'imipènème.	140
Figure 34.	Test de conjugaison pour la souche 110 résistante à l'imipènème.	141
Figure 35.	Répartition des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques sur le territoire algérien et plus particulièrement en Algérie septentrionale.	143
Figure 36.	pGEM® DNA Markers. Load 5µl/lane.	Annexe 6

Liste des tableaux

Tableau 1.	Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne.	7
Tableau 2.	Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes.	9
Tableau 3.	Classification des β -lactamases bactériennes selon Ambler et de Bush <i>et al.</i>	15
Tableau 4.	β -lactamases identifiées en Algérie.	20
Tableau 5.	Déterminants de résistance aux aminosides et aux quinolones identifiés en Algérie.	27
Tableau 6.	Différenciation des trios genres de <i>PMP</i> .	32
Tableau 7.	Différenciation biochimique au sein du genre <i>Proteus</i> .	34
Tableau 8.	Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard de l'ADNr 16S.	64
Tableau 9.	Mélange réactionnel de préparation du Mix pour PCR standards.	65
Tableau 10.	Séquences des amorces utilisées pour la PCR <i>BigDye</i> ® de l'ADNr 16S.	68
Tableau 11.	Mélange réactionnel pour la PCR <i>BigDye</i> ®.	68
Tableau 12.	Programme de l'amplification de la PCR <i>BigDye</i> ®.	68
Tableau 13.	Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard et le <i>BigDye</i> ® de l' <i>rpoB</i> .	71
Tableau 14.	Mélange réactionnel de préparation de Mix pour PCR standards.	71
Tableau 15.	Amorces utilisées pour les PCR standard des BLSE.	78
Tableau 16.	Amorces utilisées pour les PCR standard des carbapénèmases.	80
Tableau 17.	Composition du mélange réactionnel pour les PCR en temps réel.	83
Tableau 18.	Amorces utilisées pour les PCR en temps réel des carbapénèmases.	84
Tableau 19.	Programme de l'amplification de la PCR en temps réel.	85
Tableau 20.	Amorces utilisées pour les PCR standard des aminosides.	85
Tableau 21.	Amorces utilisées pour les PCR standard des quinolones.	86
Tableau 22.	Distribution des <i>PMP</i> selon la nature des prélèvements.	90
Tableau 23.	Distribution des isolats de <i>PMP</i> selon l'origine de prélèvements.	91
Tableau 24.	Distribution des <i>PMP</i> selon l'origine et la nature de prélèvements.	92
Tableau 25.	Répartition des prélèvements de patients hospitalisés en fonction des services et des espèces de <i>PMP</i> .	93

Tableau 26.	Répartition des espèces de <i>PMP</i> isolées à partir de divers échantillon et en fonction de type du traitement.	96
Tableau 27.	Confirmation de l'identification des deux souches contenant double populations.	98
Tableau 28.	Comparaison des résultats d'identification par API 20E et MALDI-TOF MS avec celles du séquençage de l'ADNr 16S.	101
Tableau 29.	Comparaison des résultats de MALDI-TOF MS de notre étude avec les résultats obtenus de la littérature.	102
Tableau 30.	Pourcentage de résistance aux antibiotiques des 304 souches de <i>PMP</i> isolées durant l'année 2011.	108
Tableau 31.	Pourcentage de résistance aux antibiotiques des 110 souches de <i>PMP</i> isolées.	111
Tableau 32.	Caracteristiques des souches de double population et des deux autres souches résistantes à l'imipenème.	112
Tableau 33.	Profils génotypiques de résistance aux antimicrobiens des 110 isolats de <i>PMP</i> .	134
Tableau 34.	Caractéristique phénotypiques et génotypiques des 110 souches de <i>PMP</i> isolées.	135
Tableau 35.	Marqueurs et gènes de résistance des souches donatrices et de leurs transconjugants.	142
Tableau 36.	Les caractères biochimiques des PMP (galerie classique).	Annexe 3
Tableau 37.	Tableau de lecture des résultats de la galerie API 20 ^E .	Annexe 4
Tableau 38.	Les services hospitaliers.	Annexe 5

INTRODUCTION GENERALE

Tout au long de l'histoire, il y a eu une bataille continuelle entre l'homme et la multitude de micro-organismes qui causent l'infection et la maladie. La peste bubonique, la tuberculose, le paludisme, et plus récemment, le virus de l'immunodéficience acquise humaine, ont affecté une partie substantielle de la population humaine provoquant une morbidité et une mortalité importante. A partir de milieu du 20^{ème} siècle, des avancées majeures dans le développement des médicaments antibactériens et autres moyens de lutte contre les infections ont aidé à renverser la tendance en faveur de l'homme. En ce qui concerne les infections bactériennes, la situation s'est considérablement améliorée lorsque la pénicilline est devenue disponible au début des années 1940. Cependant, cette révolution n'a pas duré longtemps. Presque aussitôt de l'utilisation de médicaments antibactériens, les bactéries ont répondu en manifestant diverses formes de résistance, notamment, en raison de l'utilisation massive et parfois inadéquate des antibiotiques. La multirésistance aux antibiotiques concerne principalement les bactéries à Gram négatif [1]. L'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques et leur propagation à l'hôpital, comme en ville, sont devenues une préoccupation sanitaire majeure et un problème de santé publique depuis les années 1980 [2], d'autant plus que très peu de nouvelles molécules sont mises sur le marché par l'industrie pharmaceutique, alors que les bactéries développent des mécanismes de résistance, de plus en plus astucieux [3]. Malheureusement, nous sommes confrontés à la montée croissante de cette résistance, atteignant à l'heure actuelle des niveaux alarmants.

Les entérobactéries forment une vaste famille de bactéries à Gram négatif, et sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts. Parmi ces bactéries, les genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* (*PMP*) sont souvent considéré comme responsables des contaminations et/ou des colonisations, mais sont fréquemment impliqués dans les infections hospitalières et même au cours des infections communautaires [4].

Les germes appartenant à ces trois genres sont des composants de la flore bactérienne normale de l'intestin de l'homme et des animaux et sont très répandus dans l'environnement [4]. En raison de leurs habitats variés, ils ont plusieurs voies possibles d'infection humaine. Les modes de transmission peuvent inclure des sources nosocomiales, comme la nourriture et l'équipement hospitaliers, des solutions intraveineuses et le contact humain à travers des surfaces de la peau contaminés [5], provoquant des infections

primaires et secondaires [4]. L'intérêt pour les espèces de ces genres se résume au fait que la plupart des infections sont souvent associées à une hospitalisation prolongée. Les *Proteus* et *Morganella spp.*, peuvent être les principales causes de la colonisation des cathéters et des infections des voies urinaires [5].

Ces organismes sont intrinsèquement résistants à la nitrofurantoïne et la tétracycline, mais sont naturellement sensibles aux β -lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones, et aux triméthoprim/sulfaméthoxazole [4, 5]. Cependant, la résistance aux antibiotiques a été de plus en plus observée pour ce groupe, et la diffusion de la résistance aux céphalosporines à large spectre en raison de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) est devenue une grande préoccupation [6] depuis la découverte pour la première fois, en 1987, d'une souche de *P. mirabilis* productrice de BLSE [7].

La résistance liée à la production de BLSE est un problème particulier dans le traitement des infections à *PMP*, mais d'autres mécanismes ont également émergé, conduisant à la multirésistance et menaçant de créer des espèces pan-résistantes. Les carbapénèmes sont maintenant employés fréquemment dans le traitement des infections nosocomiales graves causées par des bactéries à Gram négatif, comme les entérobactéries productrices de BLSE [8]. Cependant, l'émergence de souches cliniques de diverses espèces productrices de carbapénémase de classe D comprenant les enzymes qui hydrolyse l'oxacilline (enzymes de type OXA) a été rapporté [9]. Ces carbapénémases de classe D ont jusqu'à présent été associées à des souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes à l'imipénème [10]. Cependant, la première détection d'une souche clinique de *P. mirabilis* productrices de carbapénémase classe D a été notée en France en 2002 (production d'une OXA-23) [9].

Pour mieux contrôler l'infection avec le groupe *PMP*, une bonne et rapide identification, suivie par un antibiogramme, est une condition essentielle afin de déterminer un traitement antibiotique adéquat. Pendant longtemps, l'identification des bactéries appartenant à ces trois genres a été principalement basée sur les caractères biochimiques [4, 5]. Selon les différents travaux publiés, la séparation des genres et des espèces de ce groupe a longtemps été une problématique et soumise à des modifications périodiques car ces espèces sont phénotypiquement très similaires dans un certain nombre de points [5, 11]. Cependant, de nombreux auteurs ont indiqué que cela peut être une ressemblance superficielle qui ne reflète pas la parenté dans un sens évolutif ou

phylogénétique. L'identification moléculaire en utilisant le séquençage de gène ARN ribosomal (ARNr) 16S est l'une des techniques les plus utiles, mais reste relativement coûteuse et nécessite une charge de travail qui n'est pas adaptée pour une utilisation courante [12].

L'identification bactérienne directement à partir de colonies et des échantillons à l'aide d'une spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight mass spectrometer ; qui signifie en français : désorption-ionisation laser assistée par matrice à temps de vol) a été décrit comme un outil révolutionnaire, peu coûteux, parfaitement adapté aux laboratoires de microbiologie clinique [13], et constituant un procédé simple et utile pour l'identification rapide et précise des micro-organismes associés aux maladies infectieuses [14, 15]. Par ailleurs, même s'il est bien connu que les bactéries pourraient être facilement et rapidement identifiées en routine aux laboratoires de microbiologie clinique par MALDI-TOF, il n'y a que peu de rapports sur cette approche, y compris pour l'identification des souches isolées en Algérie à l'exception de ceux concernant *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae* [16-18].

Dans le cadre de nos activités sur la recherche d'une méthode fiable et rapide d'identification et l'étude de la résistance des *PMP* aux antibiotiques et face à des situations épidémiologiques graves concernant l'émergence et la diffusion de nombreuses souches de *PMP* de plus en plus résistants chez les patients en cours de traitements conduisant à l'échec thérapeutique, il devînt impératif de mener une étude multicentrique afin de surveiller l'émergence de nouveaux gènes de résistance et son évolution dans le temps.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'épidémiologie hospitalière et communautaire des *PMP* et notamment à celle des souches multi-résistantes en utilisant divers outils de bactériologie classique et de biologie moléculaire. Notre travail a pour objectifs principaux :

- prévalence des souches de *PMP* isolées au niveau du CHUC.
- évaluation des niveaux de résistance aux antibiotiques habituellement prescrits en thérapeutique.
- détection de gènes de résistance aux antibiotiques.

- étude du support génétique et du transfert de l'antibiorésistance.
- utilisation des techniques de biologie moléculaire et de la technique MALDI-TOF MS pour l'identification des espèces au sein du même genre.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les antibiotiques

1. Mécanisme d'activité des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances biochimiques d'origines naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques, dont l'activité bactériostatique ou bactéricide se manifeste à dose faible. La chronologie de la découverte des principales classes d'antibiotiques est représentée sur la figure 1.

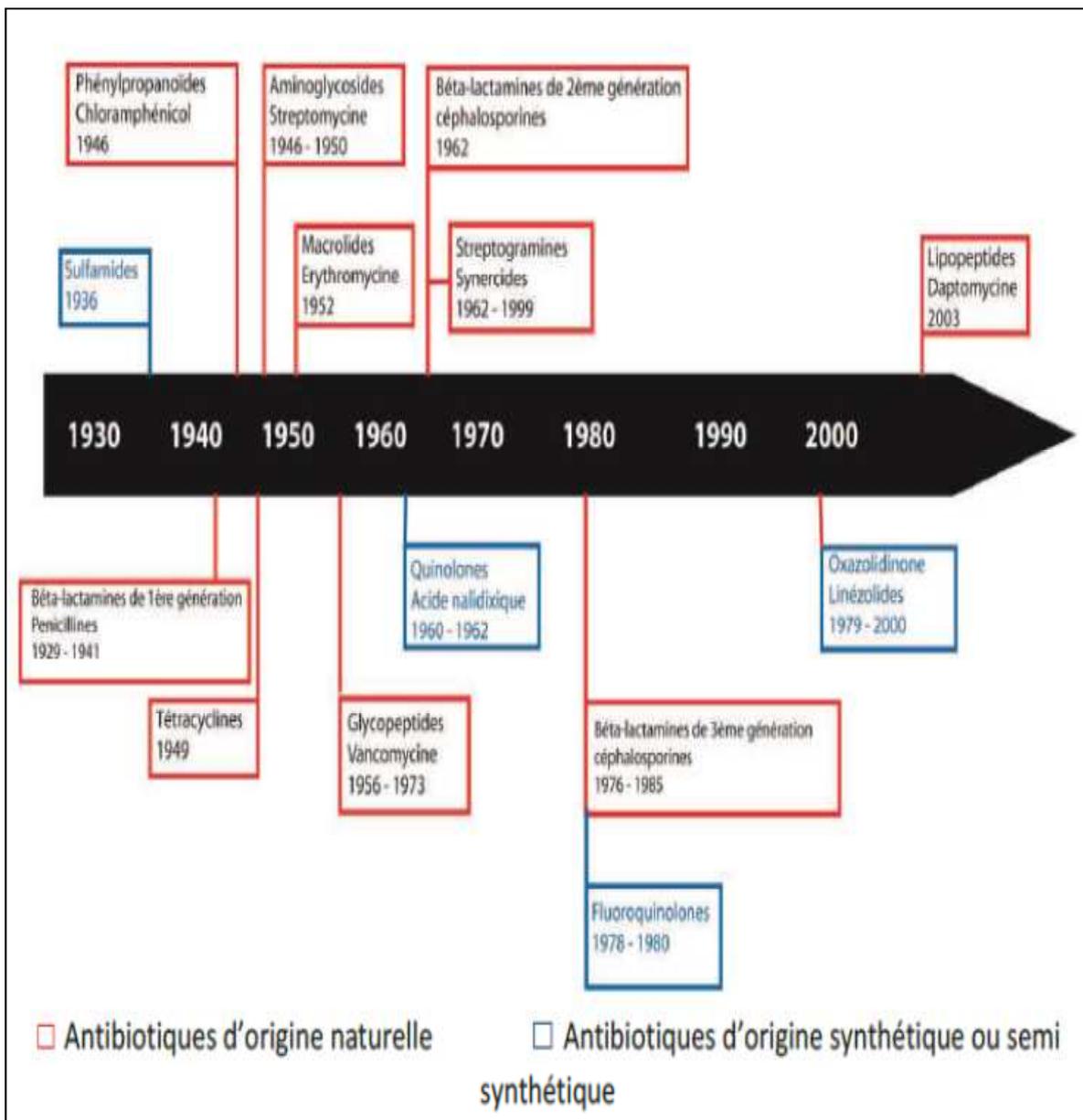


Figure 1. Chronologie de découverte des antibiotiques [19]

Les différents antibiotiques exploités en médecine thérapeutique peuvent être classés par famille chimique et par leurs modes d'action. Les cibles décrites jusqu'à présent sont la paroi, la membrane, l'acide nucléique et les ribosomes des micro-organismes.

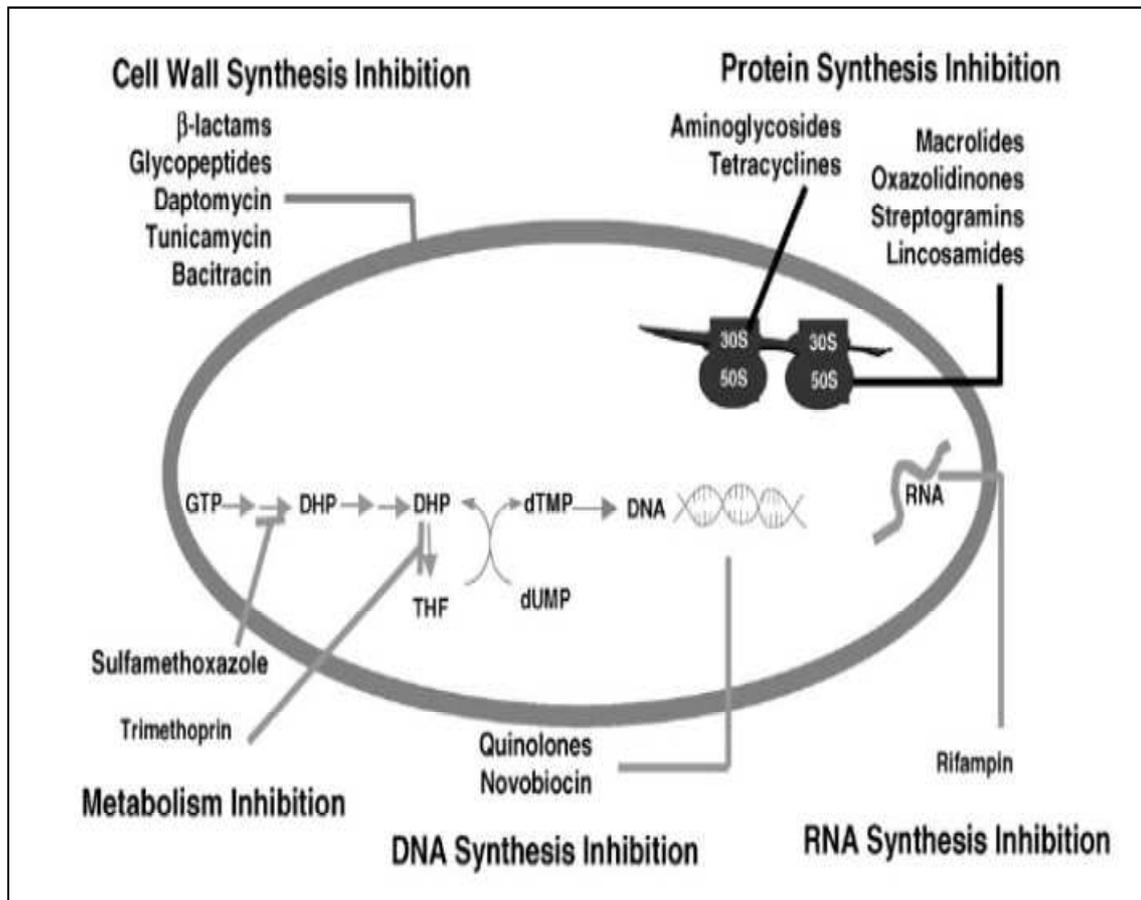
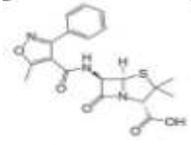
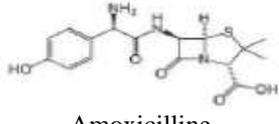
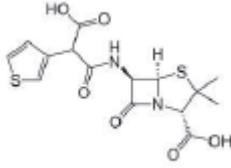
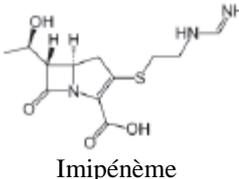
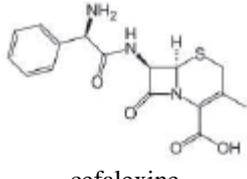
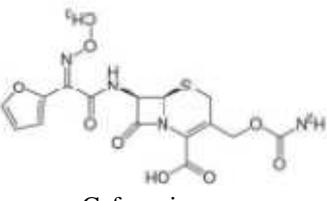
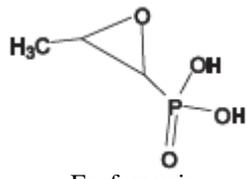


Figure 2. Mode d'action des antibiotiques [19]

1.1. Les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure rigide composée de peptidoglycane. Il s'agit d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Trois modes d'action sont utilisés par les antibiotiques présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne [20, 21]

Mode d'action	Famille	Sous-famille	Exemple	Spectre d'action
Inhibiteurs de la Transpeptidase	Pénicillines	Pénicilline G	 Oxacilline	Germe à Gram positif
		Pénicilline M		
		Pénicilline A	 Amoxicilline	Germe à Gram positif et Gram négatif
		Carboxypenicillines Uréidopénicilline Amidopénicillines	 Ticarcilline	
		Carbapénèmes	 Imipénème	
Céphalosporines	Première génération	 cefalexine	Germe à Gram positif et à Gram négatif	
	Deuxième génération	 Cefuroxime		
	Troisième génération	 Ceftazidime		
Inhibiteurs de la Polymérisation du Peptidoglycane	Glycopeptides		Vancomycine	Germe à Gram positif
Inhibiteurs de la Formation d'acide N-acétyl Muramique	Fosfomycine		 Fosfomycine	Germe à Gram positif et à Gram négatif

1.2. Les antibiotiques ciblant la membrane plasmique

Certains antibiotiques ont pour cible la membrane plasmique bactérienne avec une action bactéricide. Ces antibiotiques de type polypeptidique présentent une toxicité lors de leur administration. Ce sont des molécules naturelles produites par des bactéries du genre *Bacillus*. On peut les diviser en deux sous familles.

1.2.1. Les polypeptides tensio-actifs

Il s'agit des polymyxines ou colistines qui sont des antibiotiques cycliques isolés de *Bacillus polymyxa*. On dénombre les polymyxines A, B, C, D, E, F, K, M, P, S, et T [22], mais seulement les polymyxines B et E sont exploitées en thérapeutique. Ces antibiotiques agissent comme des détergents par leur caractère amphiphile et s'insèrent parmi les phospholipides membranaires. Cette insertion perturbe la perméabilité de la membrane bactérienne entraînant la mort cellulaire.

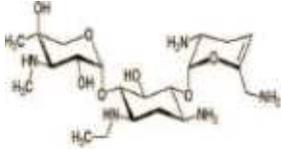
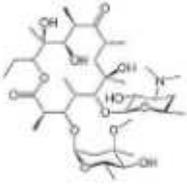
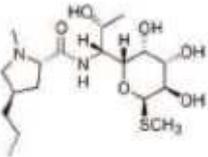
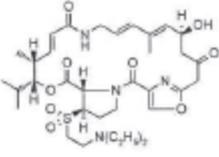
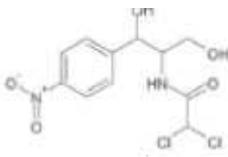
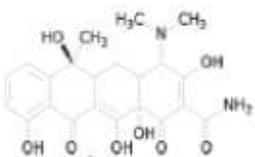
1.2.2. Les polypeptides non tensio-actifs

Dans ce groupe, on note la tyrocidine, la bacitracine et la gramicidine. Ce dernier est un mélange d'antibiotiques composé de gramicidine A (environ 80%), de gramicidine B (6%) et gramicidine C (14%) qui sont produits par *Bacillus bevis*. En s'insérant dans la membrane plasmique, la gramicidine forme des canaux et augmente la perméabilité de la membrane [23].

1.3. Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes

Les ribosomes sont des organites présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes (cellule bactérienne). Leur structure se compose de protéines et d'ARN. Ils synthétisent les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messager. La plupart des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes interfèrent avec la synthèse protéique en induisant des erreurs de synthèse ou en inhibant cette synthèse. La cellule bactérienne est ainsi dans une incapacité de synthétiser des protéines qui lui sont vitales. Les familles des antibiotiques concernées ainsi que leur mode d'actions sont présentées sur le Tableau 2.

Tableau 2. Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes [24-26]

Mode d'action	Famille	Sous famille	Exemple	Spectre d'activité
Inducteur d'erreurs de decodage	Aminosides		 <p>Netilmicine</p>	Germes à Gram positif (sauf <i>streptocoques</i>) et à Gram négatif
Inhibition de l'elongation par le site P	Macrolides, Lincosamides Synergistines	Macrolides,	 <p>Erythromycine</p>	Germe à Gram positif et à Gram négatif sauf <i>Enterobacter</i> et <i>Pseudomonas</i>
		Lincosamides	 <p>Lincomycine</p>	
		Synergistines	 <p>Dalfapristine</p>	
Inhibition de l'activité de la peptidyl transferase	Phénicoles		 <p>Chloramphénicol</p>	Germe à Gram positif et à Gram négatif
Inhibition de la fixation de l'ARN de transfert	Cyclines		 <p>Tétracycline</p>	

1.4. Les antibiotiques qui ciblent l'ARN

Pour ce mode d'action, on dénombre la famille des rifamycines, composée des rifamycines A, B, C, D, E, S et SV. Ces antibiotiques ont une structure chimique macrocyclique et sont isolés de *Amycolatopsis rifamycinica*. La rifampicine et la rifabutine sont des molécules hémi synthétisées à partir de la rifamycine B. En se liant à l'ARN polymérase, ces antibiotiques bloquent la formation de la chaîne d'ARN messager et par conséquent on assiste à un arrêt de la synthèse protéique. Les rifamycines sont des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif, sur *Mycobacterium*, quelques bactéries à Gram négatif et surtout les *Neisseria meningitidis* (Méningocoque) [27].

1.5. Les antibiotiques qui ciblent l'ADN

L'ADN est la cible des quinolones, qui forment une large famille d'antibiotiques de synthèse et dérivent de l'acide nalidixique. Ils sont caractérisés par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale, et une bonne diffusibilité dans les tissus. Les molécules de cette famille sont classées par génération à l'instar des céphalosporines [28, 29].

Les quinolones de la première génération regroupent l'acide nalidixique, l'acide pipémidique et la fluméquine. Ils sont actifs sur les bactéries à Gram négatif et leurs utilisations se limitent principalement dans le traitement des infections urinaires du fait de leur mauvaise diffusion dans les tissus.

Dans le groupe de la seconde génération, la norfloxacine est caractérisée entre autres, par l'ajout d'un atome de fluor à l'acide nalidixique en position C6 et de la pipérazine en position C7, renforçant l'activité antibactérienne. L'ajout du fluor caractérise les fluoroquinolones. La ciprofloxacine dérive de la norfloxacine avec l'apport d'un radical (cyclopropyl) sur l'azote N1. C'est un groupement qui améliore la biodisponibilité de la molécule. Toutes ces modifications chimiques à partir des quinolones de la première génération ont permis d'élargir leur spectre sur les bactéries à Gram négatif et avec une activité sur *Pseudomonas aeruginosa*. Leur spectre d'action s'étend sur les bactéries à Gram positif excluant *Streptococcus pneumoniae*. Certains antibiotiques de ce groupe comme la norfloxacine, la loméfloxacine et l'énofloxacine, par leur biodisponibilité insuffisante, sont exploités uniquement dans le traitement des infections urinaires. Les

autres antibiotiques tels que la ciprofloxacine, l'ofloxacine sont utilisés pour le traitement d'une grande gamme d'infections.

Concernant les quinolones de la troisième génération, on note une activité sur les bactéries à Gram positif y compris le genre *Streptococcus* et les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis* (anciennement *Branhanella catarrhalis*). Cette dernière activité les qualifie de « quinolones des infections respiratoires ». Ce groupe renferme la balofloxacine, la grépafloracine, la lévofloxacine, la pazufloxacine, la sparfloxacine et la tosufloxacine.

Les nouvelles quinolones dites « de quatrième génération », en complément du spectre d'activité des quinolones de troisième génération, ont une activité qui s'étend aux bactéries anaérobies.

Les quinolones sont des antibiotiques qui se présentent avec deux cibles moléculaires dont l'ADN et la topoisomérase. Ces antibiotiques possèdent une région qui se lie par liaison hydrogène à l'ADN bactérien. Il s'agit de la région de la molécule qui comporte le groupe carbonyle de la quinone. Cette molécule établit également une interaction spécifique avec les enzymes de type topoisomérase (Figure 3). Ce sont des enzymes qui permettent le déroulement de l'ADN pour sa transcription ou l'enroulement de l'ADN après sa transcription. Elles contrôlent donc plus loin la synthèse des protéines ou encore la division cellulaire de la bactérie. L'interaction des quinolones avec ces enzymes se fait par les radicaux qui jouxtent la quinone.

Selon plusieurs auteurs, les interactions entre ces antibiotiques avec l'ADN et les topoisomérases induisent la formation d'un complexe ternaire qui inhibe l'activité de l'enzyme impliquée dans cette réaction. Une cartographie de la structure chimique des quinolones qui met en évidence la relation structure-activité de ces antibiotiques a été donc établie (Figure 3) [30-32].

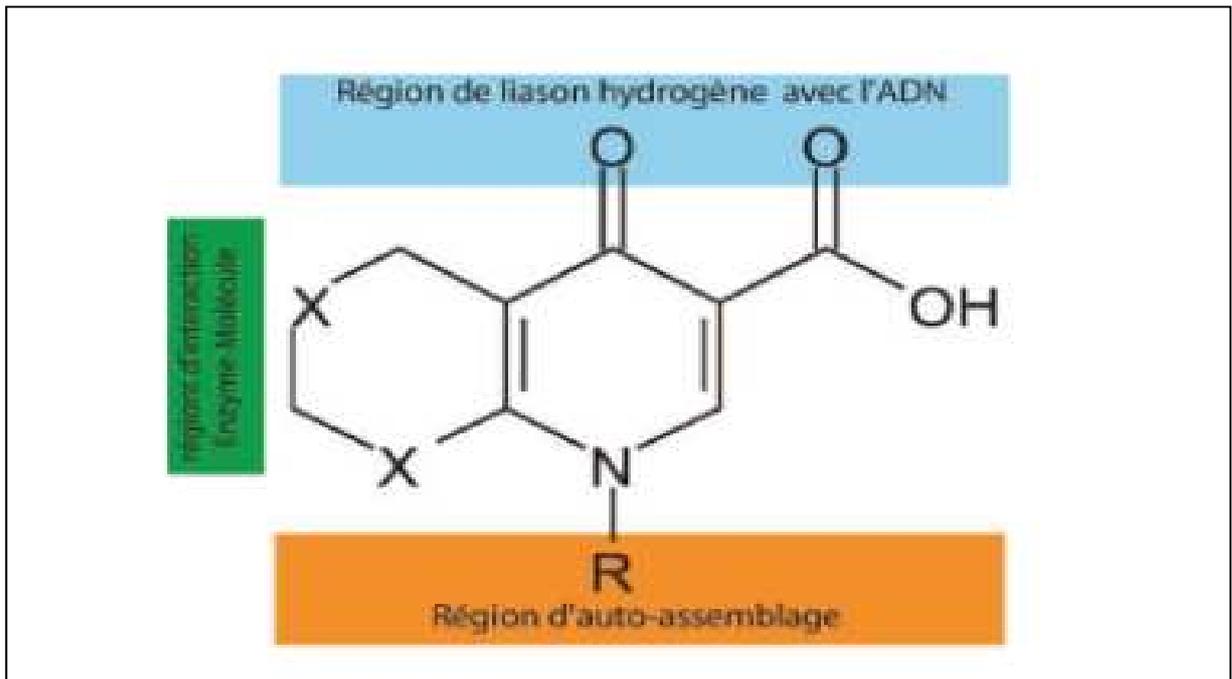


Figure 3: Régions fonctionnelles des quinolones

2. Les résistances aux antibiotiques

Après une période de forte efficacité contre les maladies infectieuses, les antibiotiques se présentent de moins en moins efficaces face à certaines infections bactériennes. Dès 1940, juste après la découverte de la pénicilline, Abraham et Chain avaient mis en évidence l'existence de résistance à cet antibiotique chez *E. coli* [33]. Les bactéries s'adaptent aux antibiotiques et deviennent résistantes.

2.1. Résistance aux β -lactamines

Les β -lactamines demeurent les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité, à leur pouvoir bactéricide et à la diversité des molécules [34]. En effet, depuis l'introduction de la pénicilline G en thérapeutique dans les années 40, un grand nombre de molécules incluant les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes a été développé [35]. Cependant, les bactéries à Gram négatif hébergent naturellement et ont acquis différents mécanismes limitant leur activité. Ces résistances sont liées à un défaut d'accumulation au contact de la cible suite à une imperméabilité ou à un efflux de

l'antibiotique, à des modifications des PLP ou à la production d'enzymes inactivatrices appelées β -lactamases [34].

2.1.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique : Les β -lactamases

Les β -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux β -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif [36]. Ces enzymes sont capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle [37]. Les deux schémas les plus utilisés pour la classification des BLSE sont celui d'Ambler qui est fondé sur l'homologie de séquence des acides aminés et de Bush-Jacoby-Medeiros qui est fondé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes.

2.1.1.1. Classification de β -lactamases

A. Classification d'Ambler

Cette classification proposée en 1980 permet de regrouper les β -lactamases en quatre classes en fonction de leurs homologies structurales [38]. Les enzymes appartenant aux classes A, C et D selon la classification d'Ambler sont des enzymes à serine active. Les BLSE appartiennent soit au groupe A (types TEM, SHV, CTX-M) et en plus petit nombre au groupe D (type OXA). Les β -lactamases du groupe C sont des céphalosporinases (type AmpC) mais non BLSE. Le groupe B contient des enzymes comportant deux atomes de zinc au site actif. Elles sont désignées comme métallobetamases et peuvent hydrolyser les carbapénèmes [39].

✓ **Les β -lactamases de classe A**, ou pénicillinases, constituent le groupe le plus important. Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline) et sont sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam).

✓ **Les β -lactamases de classe B**, ou métallobetamases, hydrolysent toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Ces β -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases classiques mais sont inactivées in vitro par des agents chélateurs d'ions bivalents comme l'EDTA.

✓ Les **β -lactamases de classe C**, ou céphalosporinases, hydrolysent préférentiellement les céphalosporines (céfalotine, ceftazidime, céfuroxime). Elles sont inhibées par la cloxacilline mais pas par les inhibiteurs de β -lactamases.

✓ Les **β -lactamases de classe D**, ou oxacillinases, constituent un groupe hétérogène. Elles sont caractérisées par une hydrolyse plus rapide de l'oxacilline et de la cloxacilline que de la benzylpénicilline. Les oxacillinases classiques sont inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium.

B. Classification Bush et al.

La classification de Bush *et al.* est fondée sur les caractéristiques physicochimiques des enzymes comme leur point isoélectrique, poids moléculaire, substrat d'activité et profil d'inhibition. Les BLSE appartiennent à la catégorie 2be et 2d de cette classification [40].

Tableau 3. Classification des β -lactamases bactériennes selon Ambler et de Bush *et al.* [40]

Bush	Ambler	Substrats Préférentiels	Inhibition par		Enzymes Représentatives
			AC ^a	EDTA	
1	C	Céphalosporines	-	-	AmpC, CMY-2, MIR-1
2a	A	Pénicillines	+	-	PC1
2b	A	pénicillines, céphalosporines	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	pénicillines, céphalosporines à large spectre, monobactames	+	-	BLSE TEMs, SHVs, CTX-Ms
2br	A	Pénicillines	+/-	-	IRT TEMs
2c	A	pénicillines, carbenicilline	+	-	PSE-1
2d	D	pénicilline, cloxacilline	+/-	-	OXAs
2e	A	Céphalosporines	+	-	FEC-1
2f	A	pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes	+	-	KPC-1, SME-1
3	B	la plupart des β -lactamines	-	+	L1, CcrA
4 ^b					

^a acide clavulanique

^b La classe 4 regroupe les bêta-lactamases qui ne peuvent être classées dans les autres classes.

2.1.1.2. Mode d'action des β -lactamases

Le mécanisme d'hydrolyse se déroule en trois étapes :

1. Liaison non-covalente et réversible entre la β -lactamase et la β -lactamine.
2. Rupture du noyau β -lactame par acétylation covalente avec la sérine du site actif.
(formation d'un complexe acyl-enzyme intermédiaire avec les β -lactamines).

3. Intervention d'une molécule d'eau permettant l'hydrolyse de l'acyl-enzyme pour réactiver la β -lactamase et libérer la molécule d'antibiotique inactivée.

La figure 4 représente le mécanisme d'hydrolyse pour les enzymes à sérine active.

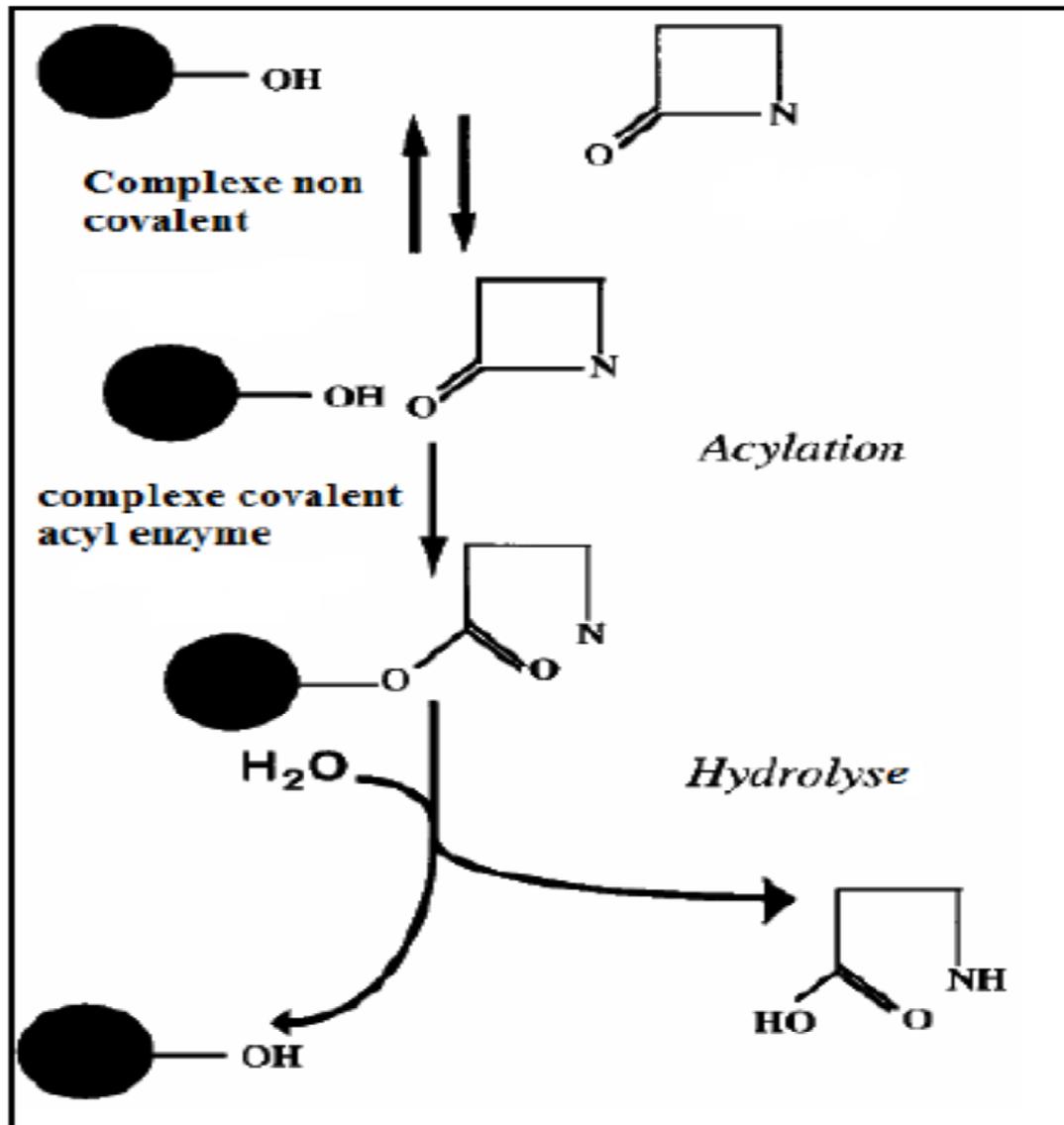


Figure 4. Mécanisme d'action des β -lactamases à sérine active

2.1.1.3. Type de β -lactamases

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE), découvertes initialement chez les souches de *K. pneumoniae* en Allemagne et en France, sont des enzymes de classe A plasmidiques qui présentent un fort potentiel de diffusion à travers le monde [34, 41]. Ces enzymes

confèrent une résistance à la quasi-totalité des β -lactamines, excepté les céphamycines (céfoxitine, céfotétan) et les carbapénèmes, et elles sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam [37]. Les gènes codant pour ces enzymes sont principalement situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons), expliquant la rapidité de leur diffusion [42].

Différents type de BLSE ont été décrit depuis leur première description dans les années 90 :

A. BLSE de type TEM (Temoneira - nom du patient)

La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Actuellement, il y a plus de 140 enzymes TEM (<http://www.lahey.org/studies/>) dont plus de 100 avec un phénotype de BLSE. Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). Les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C3G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes [43].

B. Type SHV (Sulfhydryl variable)

Après TEM, le type SHV constitue celui comportant le plus grand nombre (supérieur à 70) d'enzymes BLSE (<http://www.lahey.org/studies/>). Comme dans le cas des enzymes de type TEM, les enzymes de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1. L'origine de ces enzymes est probablement une variante de l'enzyme chromosomique K2 de *K. pneumoniae* [43-45].

C. Type OXA (Oxacillinase)

Ces enzymes possèdent une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. À l'exception de l'OXA-18, elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Il y'a actuellement 11 BLSE du groupe OXA, dérivées de OXA-1, OXA-2 et OXA-10 (<http://www.lahey.org/studies/>). En général, elles hydrolysent mieux la ceftazidime que le céfotaxime. Ces enzymes ont été fréquemment observés chez *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi chez les entérobactéries, particulièrement en France

et en Turquie. Les BLSE de type OXA sont codés par des gènes portés par des éléments mobiles comme les transposons et intégrons [43, 46].

Certaines enzymes de cette classe (OXA-21, OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-58) confèrent une résistance aux carbapénèmes (méro-pénème ou imipénème) et ont une large diffusion parmi les *Acinetobacter* [39, 47].

D. Type CTX-M (Céfotaximase –Munich)

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTXM- 1) et ont depuis lors disséminé largement dans le monde [37]. Sur la base de leur apparentement de séquences d'acides aminés, il semble qu'elles dérivent des céphalosporinases chromosomiques des bactéries du genre *Kluyvera*. Il existe actuellement 40 enzymes qui sont classées phylogénétiquement en cinq groupes (<http://www.lahey.org/studies/>). À la différence des types précédents, les CTX-M confèrent une résistance marquée au céfotaxime (origine de son nom) et au céfépime. En revanche, l'inactivation de la ceftazidime est plus limitée, à l'exception d'enzymes récemment décrites (CTX-M-15, CTXM-16, CTX-M-27) qui ont une forte capacité hydrolytique pour la ceftazidime. Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique. Ces BLSE ont été retrouvées majoritairement chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*. Leur émergence parmi d'autres espèces et genres d'entérobactéries est rapide [37, 48]. Les groupes 1, 9 et 2 sont actuellement prédominants. Dans la majorité des isolats cliniques, ces enzymes sont codées par des plasmides de 60–160 kb, au sein desquels coexistent fréquemment des gènes codant pour d'autres β -lactamases comme TEM-1, TEM-2 ou OXA-1. La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion IEScp1 [37, 43, 48].

E. Autres types de BLSE

D'autres types plus rares de BLSE, appartenant à la classe A, incluent BES, GES–IBC, VEB, SFO, TLA et PER. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et en général ont le même substrat que TEM et SHV [43]. Les enzymes BES-1, SFO-1 et TLA-1 ont été retrouvées chez les entérobactéries. Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* mais aussi chez les

entérobactéries. Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam et ont été retrouvées chez les entérobactéries dans le Sud-Est asiatique et chez *A. baumannii* en France [49]. Les souches productrices de GES ont été plus isolées en Afrique du Sud, Grèce et en France [50, 51]. PER-1 a été observée chez *P. aeruginosa* mais aussi chez *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis* et *Acinetobacter spp.* *P. aeruginosa* producteur de PER-1 a été isolé en Italie et en France [52, 53].

F. Les β -lactamases de la classe C

Les β -lactamases de la classe C (AmpC) sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Ces céphalosporinases sont cliniquement importantes chez *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp* et *Providencia spp* du fait de la fréquence de mutants hyperproducteurs parmi ces espèces. Les β -lactamases AmpC sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime. Ces β -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases. Le gène AmpC constitutif est faiblement exprimé chez *E. coli* et est absent chez *Klebsiella* et *Salmonella spp*. Cependant, ces espèces peuvent acquérir différents sous-groupes d'AmpC codés par des plasmides. Ce sont des AmpC dérivées de *C. freundii* (BIL-1, CMY-2, LAT-1,2), d'*Enterobacter cloacae* (MIR-1, ACT-1) ou encore de *P. aeruginosa* (CMY-1, FOX-1, MOX-1). Actuellement, il existe plus de 20 β -lactamases AmpC différentes codées dans des plasmides [54, 55].

De nombreuses autres études ont rapporté la présence de ces enzymes aussi bien en milieu hospitalier que communautaire en Algérie (tableau 4).

Tableau 4. β -lactamases identifiées en Algérie [56].

Références	Année	Journal	Espèces concernées	Enzymes décrites	Lieu
Koeck <i>et al.</i>	1997	FEMS Microbiol Lett	<i>Salmonella senftenberg</i>	CMY-2	NP
Decre <i>et al.</i>	2002	J. Antimicrob Chemother	<i>Proteus mirabilis</i>	CMY-12	Constantine
Aubert <i>et al.</i>	2005	Antimicrob Agents Chemother	<i>Providencia stuartii</i>	VEB-1	Alger
Naas <i>et al.</i>	2005	J. Antimicrob Chemother	<i>Salmonella enterica</i>	CTX-M-3	Constantine
Touati <i>et al.</i>	2006	Int. J. Antimicrob Agents	<i>Enterobacteriaceae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Béjaia
Ramdani-Bouguessa <i>et al.</i>	2006	J. Clin Microbiol	<i>E. coli</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Alger
Touati <i>et al.</i>	2007	Microb. Drug Resist.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>E. coli</i>	CTX-M-15	NP
Touati <i>et al.</i>	2008	Pediatr. Infect. Dis. J.	<i>S. enterica</i>	CTX-M-15	NP
Touati <i>et al.</i>	2008	J. Hosp. Infect.	<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	NP
Touati <i>et al.</i>	2008	Diagn. Microbiol. Infect. Dis.	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-15	Béjaia
Drissi <i>et al.</i>	2008	Med. Mal Infect.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TEM-110	Tlemcen
Iabadene <i>et al.</i>	2008	J. Antimicrob. Chemother.	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-3; CTX-M-15; SHV-12; VEB-1	Alger ; Tizi-Ouzou; Tlemcen
Messai <i>et al.</i>	2008	Pathol. Biol.	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Alger
Iabadene <i>et al.</i>	2009	Med. Mal Infect.	<i>S. enterica</i>	CTX-M-14	Tizi-Ouzou

Tableau 4. β -lactamases identifiées en Algérie [56] (suite 1)

Références	Année	Journal	Espèces concernées	Enzymes décrites	Lieu
Iabadene <i>et al.</i>	2009	Int. J. Antimicrob Agents	<i>Enterobacteriaceae</i>	CTX-M-15 ; SHV-12 ; CMY-2 ; DHA-1	Alger
Naas <i>et al.</i>	2009	J. Antimicrob. Chemother	<i>S. enterica</i>	CTX-M-3	Constantine
Iabadene <i>et al.</i>	2009	Antimicrob Agents Chemother	<i>Proteus vulgaris</i> ; <i>P. stuartii</i>	PER-1	Alger
Meradi <i>et al.</i>	2011	Pathol. Biol.	<i>Enterobacteriaceae</i>	CTX-M-28	Annaba
Mugnier <i>et al.</i>	2010	Emerg. Infect. Dis.	<i>A. baumannii</i>	OXA-23	NP
Robin <i>et al.</i>	2010	Antimicrob. Agents Chemother	<i>Enterobacteriaceae</i>	VIM-19	Alger
Touati <i>et al.</i>	2010	J. Hosp. Infect.	<i>E. cloacae</i> ; <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	NP
Drissi <i>et al.</i>	2010	Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-58	Tlemcen
Ramdani-Bouguessa <i>et al.</i>	2011	J. Med. Microbiol.	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-3; CTX-M-15; SHV-98 ; SHV-99; SHV-100	Alger
Naas <i>et al.</i>	2011	I. J. Antimicrob. Agents.	<i>S. enterica</i>	CTX-M-15	Constantine
Bouzidi <i>et al.</i>	2011	J. Antimicrob. Chemother.	<i>Salmonella non-Typhi</i>	CTX-M-15	Annaba
Bogaerts <i>et al.</i>	2011	J. Antimicrob Chemother	<i>A. baumannii</i>	NDM-1	NP
Nedjai <i>et al.</i>	2012	Med. Mal. Infect.	<i>Klebsiella</i> sp. ; <i>Enterobacter</i> sp. ; <i>Serratia</i> sp.	CTX-M-3 ; CTX-M-15 ; SHV-12 ; DHA-1	Annaba
Kempf <i>et al.</i>	2012	PLoS. One.	<i>A. baumannii</i>	OXA-23 ; OXA-24	NP

Tableau 4. β -lactamases identifiées en Algérie [56] (suite 2)

Références	Année	Journal	Espèces concernées	Enzymes décrites	Lieu
Touati et al.	2012	Int. J. Antimicrob. Agents	<i>A. baumannii</i>	OXA-23 ; OXA-58	Annaba
Boulanger et al.	2012	Antimicrob. Agents Chemother	<i>A. baumannii</i>	NDM-1	Oran
Touati et al.	2012	Int. Res. J. Microbiol.	<i>Enterobacteriaceae</i>	CTX-M-15	Alger
Gharout-Sait et al.	2012	African. J. Microbiol. Res.	<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>E. cloacae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Béjaia
Kermas et al.	2012	Foodborne. Pathog. Dis.	<i>S. enterica</i>	CTX-M-15 ; TEM-4 ; TEM-48 ; TEM-188	Alger
Bakour et al.	2012	J. Med Microbiol	<i>A. baumannii</i>	OXA-23 ; OXA-72	Sétif ; Tizi-Ouzou
Touati et al.	2013	Antimicrob. Agents Chemother	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	Annaba
Berrazeg et al.	2013	J. Med. Microbiol.	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15; SHV-12; SHV-28; SHV-1	NP
Mesli et al.	2013	Int. J. Infect. Dis.	<i>A. baumannii</i>	OXA-23; OXA-24; NDM-1	NP

NP : non précisé

2.1.2. Diminution de la perméabilité membranaire

Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe composée de LPS et de phospholipides et forme une barrière qui empêche la pénétration des antibiotiques hydrophobes entraînant une résistance naturelle à ces antibiotiques, le plus souvent à bas niveau. Les substances hydrophiles peuvent tout de même traverser cette barrière en passant par les porines. Ces porines permettent l'échange d'information essentielle et de matériels pour la survie des cellules dans l'environnement, mais elles permettent également aux antibiotiques de traverser la paroi bactérienne [57-60]. Au cours des dernières décennies, les bactéries ont acquis une résistance par une combinaison de réactions enzymatiques et la modification de la perméabilité membranaire par des altérations dans l'expression des porines [61-63]. La régulation de l'expression des porines et les mécanismes de diffusion de substances peuvent jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Trois mécanismes ont été rapportés : diminution de l'expression de la porine, altération de l'expression de la porine et la mutation de la porine.

2.1.3. Modification de la cible

Pour être efficace, un antibiotique doit être en mesure de détecter sa cible à l'intérieur de la bactérie. Si la cible est modifiée ou remplacée de sorte que l'antibiotique n'est plus capable de se lier à elle, la bactérie devient alors résistante. Ce mécanisme de résistance aux β -lactamines est très fréquent chez les bactéries à Gram positif. Les β -lactamines trouvent leur cible qui sont les PLP dans l'espace périplasmique après avoir traversées la membrane externe via les porines [64]. Des mutations au niveau des PLPs peuvent engendrer une perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible, entraînant une réduction de sensibilité aux β -lactamines sans affecter leur fonction dans l'élaboration du peptidoglycane [65].

2.1.4. Mécanisme d'efflux actif

Les bactéries à Gram négatif qui sont pratiquement imperméables pour une grande variété de composés possèdent différents canaux protéiques impliqués dans leur transport. Parallèlement aux porines qui permettent aux nutriments de pénétrer dans la cellule, les bactéries utilisent des pompes à efflux qui contribuent à diminuer la concentration

intracellulaire de composés toxiques comme les médicaments, les détergents et sont donc impliqués dans le contrôle de la sensibilité aux antibiotiques. La première pompe à efflux qui a été rapportée était responsable de la résistance à la tétracycline en 1980 [66]. Depuis, cinq familles différentes de pompes à efflux ont été identifiées sur la base de la similarité en séquence (Figure 5). Ce sont les MATE (multi drug and toxic compound extrusion), MFS (major facilitator superfamily), SMR (staphylococcal multi résistance), RND (resistance-nodulation-cell division proteins) et ABC (ATP-binding cassette) [66, 67].

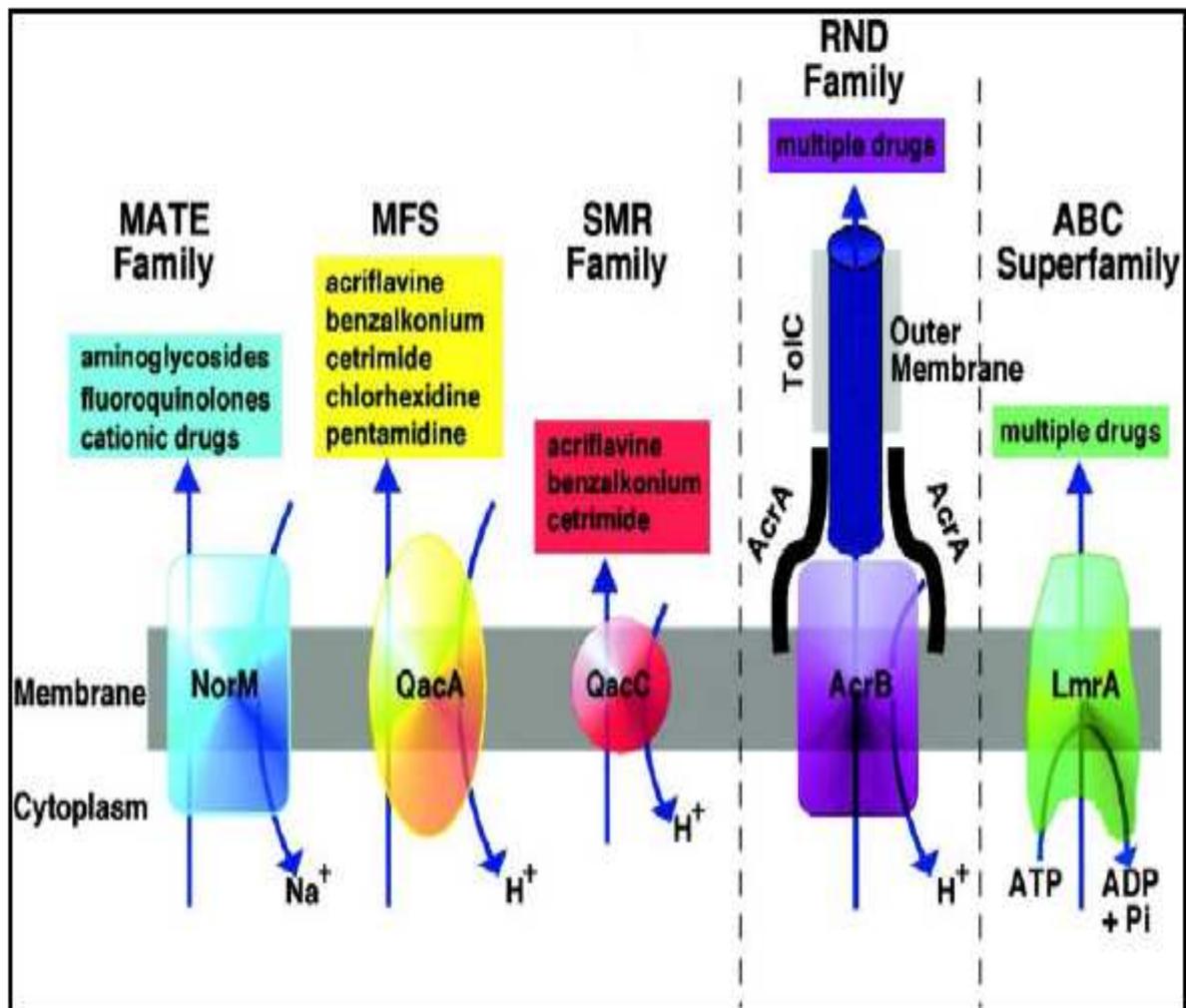


Figure 5. Les différentes familles des pompes à efflux

2.2. Résistance aux aminosides

Le premier des aminosides, la streptomycine, a été signalé en 1944 [68], une contribution fondamentale qui a ouvert la voie à la découverte d'une série d'autres aminosides et d'autres antibiotiques à partir de sources naturelles dans les deux prochaines décennies. Les aminosides continuent à jouer un rôle important dans le traitement des infections sévères dues aux pathogènes à Gram négatif souvent en association avec les β -lactamines à large spectre [69]. Ces antibiotiques agissent en se liant au site aminoacyl (site A) de l'ARN16S de la petite sous-unité ribosomale 30S des procaryotes et interfèrent avec la synthèse des protéines [70]. La liste des aminosides utilisés en thérapeutique humaine est restreinte puisque limitée à la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la nétilmicine. Leur utilisation a contribué à la sélection de souches résistantes par différents mécanismes incluant : les enzymes-modifiant les aminosides (AME), la diminution de la perméabilité membranaire, l'altération structurale de la cible ribosomale et l'expulsion de l'antibiotique par système d'efflux [71].

Le mécanisme majeur de la résistance à l'aminoglycoside est la modification enzymatique des acides ou des groupes hydroxyle de ces antibiotiques. Les Aminoglycosides modifiés se lient faiblement au ribosome [72] et ne parviennent pas à déclencher l'énergie dépendante de la phase II, qui permet aux bactéries de survivre en présence de l'antibiotique. Trois familles d'enzymes modifiant les aminosides dans le cytoplasme bactérien ont été reconnues, ce sont les aminoglycosides acétyltransférases (AAC), les aminoglycosides nucléotidyltransférases (ANT) et les aminoglycosides phosphotransférases (APH) [73]. Ces enzymes ont été par la suite divisées en classes sur la base du site de modification (indiqué en parenthèse) et en sous classes en fonction du phénotype de résistance aux aminosides (indiqué en chiffre romain). Les enzymes de même classe et sous-classe mais codées par des gènes différents sont désignées par une lettre minuscule à la fin [74]. Dans un autre système de nomenclature, les gènes sont désignés *aac*, *aad* et *aph* suivis par une lettre majuscule qui identifie le site de modification. Un chiffre est ajouté à la fin pour identifier les différents gènes [75]. Les gènes codant les AME sont généralement trouvés en tant que gènes cassettes dans des intégrons sur des plasmides ou des transposons, souvent associés aux autres gènes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones [74].

Plus récemment, un autre mécanisme de résistance aux aminosides a été décrit. Il s'agit de l'auto- protection de la cible ribosomale par la méthylation d'un nucléotide spécifique dans le site A de l'ARNr 16S, ce qui empêche la liaison de l'aminoside à la sous-unité 30S du ribosome chez les microorganismes producteurs de ces antibiotiques (*Streptomyces spp.* et *Micromonospora spp.*) [69]. Le gène codant pour ce mécanisme, nommé *armA*, a été par la suite retrouvé respectivement chez des souches cliniques de *K. pneumoniae* et de *P. aeruginosa* en France et au Japon en 2003 [76, 77]. Ces souches présentaient de hauts niveaux de résistance à l'ensemble des aminosides utilisés en clinique tel l'amikacine, la tobramycine et la gentamicine [69]. A l'heure actuelle, huit autres déterminants de méthylases de l'ARNr-16S (*RMTases-16S*) ont été identifiés [78, 79]. Ces gènes sont généralement portés par des éléments génétiques mobiles retrouvés intégrés dans des plasmides transférables appartenant à divers groupes d'incompatibilité [80]. Ils ont été rapportés chez des souches d'entérobactéries produisant des BLSEs, essentiellement les CTXM- 15 [81, 82], CTX-M-9 et CTX-M-14 [83, 84] et des carbapénémases tel NDM-1 [82, 85] et KPC [86, 87]. Ils ont également été identifiés chez des souches d'*A. baumannii* produisant l'OXA-23 et de *P. aeruginosa* produisant la SPM-1 [69, 88, 89].

La découverte et la distribution de ces gènes en Algérie est représentée sur le tableau 5.

Tableau 5. Déterminants de résistance aux aminosides et aux quinolones identifiés en Algérie [56].

Références	Année	Journal	Espèces concernées	Enzymes décrites	Lieu
Bogaerts et al.	2007	J. Antimicrob. Chemother.	<i>Enterobacteriaceae</i>	ArmA	NP
Touati et al.	2008	Diagn. Microbiol. Infect. Dis.	<i>Enterobacter cloacae</i>	QnrB	Béjaia
Iabadene et al.	2008	J. Antimicrob. Chemother.	<i>E. cloacae</i>	QnrB1 ; QnrB4 ; QnrS1	Alger ; Tizi-Ouzou; Tlemcen
Iabadene et al.	2009	Med. Mal Infect.	<i>Salmonella enterica</i>	AAC(3')-II	Tizi-Ouzou
Naas et al.	2009	J. Antimicrob. Chemother.	<i>S. enterica</i>	ArmA	Constantine
Meradi et al.	2011	Pathol. Biol.	<i>Enterobacteriaceae</i>	QnrB1 ; AAC(6')-Ib ; AAC(6')-Ib-cr	Annaba
Naas et al.	2011	Int. J. Antimicrob. Agents	<i>S. enterica</i>	ArmA	Constantine
Bouzidi et al.	2011	J. Antimicrob. Chemother.	<i>Salmonella non-Typhi</i>	ArmA	Annaba
Gharout-Sait et al.	2012	African. J. Microbiol. Res.	<i>Escherichia coli; Klebsiella pneumoniae ; E. cloacae</i>	QnrB1 ; QnrS1 ; AAC(6')-Ib-cr	Béjaia
Touati et al.	2013	Antimicrob. Agents Chemother.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>aadB ; aacA4</i>	NP
Mesli et al.	2013	Int. J. Infect. Dis.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>aac(3)-I ; aadA ; ant(2'')-I ; aph(3') ; aac(6')-Ib</i>	NP

NP : non précisé

2.3. Résistance aux quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse dont les cibles d'action sont les topoisomérases II (ADN gyrase) et topoisomérases IV [90, 91]. Ces molécules sont généralement classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et leur date de mise sur le marché [92]. Leur large utilisation en médecine humaine et vétérinaire a conduit à l'émergence et à l'augmentation de la prévalence de la résistance acquise chez toutes les espèces bactériennes à travers le monde [93]. La résistance chromosomique aux quinolones chez les entérobactéries résulte essentiellement d'accumulation de mutations dans l'ADN gyrase (*Gyr A*) puis dans la topoisomérase IV [94]. Les mutations apparaissent quasi-exclusivement dans de courtes régions conservées, situées entre les acides aminés 67 et 106, appelées *QRDR* [30] [95-97]. De plus, la résistance chromosomique aux quinolones peut être associée à la diminution de la perméabilité membranaire et/ou à la surexpression des systèmes d'efflux [98-101].

Récemment, trois mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones ont été décrits. Le premier déterminant *PMQR* (Plasmid Mediated Quinolones Resistance), correspondant à la protéine QnrA1, a été identifié en 1998 [102]. Le gène codant a été identifié sur un large plasmide conjugatif isolé à partir d'une souche de *K. pneumoniae* résistante à la ciprofloxacine [102]. QnrA1 est une protéine de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés. Elle entre en compétition avec les quinolones pour l'accessibilité de l'ADN gyrase [103] et peut être aussi la topoisomérase IV [104]. Quatre autres déterminants *Qnr-like* (*qnrB*, *qnrS*, *qnrC* et *qnrD*) ainsi que différents variants des protéines QnrA (n=7), QnrB (n=42) et QnrS (n=5) ont été identifiés chez les entérobactéries [105-108]. Ces gènes sont généralement trouvés en tant que gènes cassettes dans des intégrons de classe 1 sur des plasmides qui souvent hébergent d'autres gènes de résistance aux β -lactamines, aminosides, chloramphénicol, tétracyclines, sulfamides, triméthoprim et rifampicine [109]. L'ensemble des déterminants *Qnr* a été identifié dans le monde dans différentes espèces d'entérobactéries, essentiellement *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *E. coli* et *Salmonella enterica*, aussi bien en milieu hospitalier que communautaire [110].

Le deuxième déterminant *PMQR* identifié est le *aac(6')-Ib-cr*. Ce déterminant a été découvert pour la première fois en 2006 chez une souche d'*E. coli* qnrA-positive en Chine [111]. Il se distingue de son progéniteur, le *aac(6')-Ib*, par le remplacement de deux acides

aminés, Trp102Arg et Asp179Tyr et confère une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et à la norfloxacine [111]. En général, *aac(6′)-Ib-cr* est identifié comme gène cassette au sein d'intégron de classe 1 [112]. Il est souvent associé à d'autres gènes de résistance aux quinolones tels les différents variant *qnr*, les BLSEs (*CTX-M-1*, *CTX-M-14*, *CTX-M-15*, *CTX-M-24*), les céphalosporinases plasmidiques (*DHA-1*) et les carbapénémases (*KPC-2*) [113]. Il a été essentiellement identifié chez des souches cliniques d'*E.coli* et de *K. pneumoniae* [109].

Enfin, le troisième déterminant *PMQR* est le gène *qepA* qui code pour une pompe d'efflux actif (QepA1 et QepA2) responsable d'une diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine) [114, 115]. Il a été décrit chez des souches d'*E.coli* en France, au Japon et en Belgique [114], souvent associé aux déterminants *rmtB*, *qnrS* et *aac(6′)-Ib-cr* [116]. Il n'a pas encore été rapporté en Algérie.

En Algérie, les gènes codants pour la résistance aux quinolones sont présentés sur le tableau 5.

Chapitre 2 : *Proteus, Morganella et Providencia*

1. Introduction

Les bactéries des genres *Proteus*, *Morganella*, et *Providencia* (*PMP*) appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. En raison de la forte similitude entre ces trois genres, ces trois genres ont été placés dans la tribu *Proteeae*, cependant, la désignation de la tribu n'est plus utilisée [117]. La taxonomie de *PMP* est une histoire fascinante qui est empêtrée dans toute l'histoire dès le début de l'évolution de la science de la microbiologie. Les espèces appartenant à ces genres ne sont pas considérées comme pathogènes direct, contrairement à certains autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, et sont souvent isolés dans les laboratoires cliniques. Comme avec d'autres agents pathogènes opportunistes, ils peuvent provoquer la morbidité et la mortalité. Bien que tous ces organismes soient omniprésents dans l'environnement, des rapports épidémiologiques indiquent qu'ils sont capables de causer de graves problèmes de maladies infectieuses, et qu'ils sont souvent en cause dans des infections urinaires [4]. La plupart des infections sont associées à une hospitalisation prolongée et dans le cas de *Proteus* et *Morganella*., à la colonisation des cathéters et aux infections des voies urinaires (IVU) associés [5].

Les trois genres de *PMP* comprennent actuellement un total de huit espèces. Les bactéries de ce groupe peuvent être différenciées par les tests biochimiques énumérés dans le tableau 6. Ils ont une caractéristique biochimique qui les distingue de tous les autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, à l'exception des genres rare *Tatumella* et *Rahnella*, la capacité de désamination oxydative de certains acides aminés à l'acide cétonique correspondant et de l'ammoniac. Les tests de phénylalanine ou tryptophane désaminase sont les plus couramment réalisés et une méthode rapide pour cette réaction a été mise au point depuis 1985 par Giammanco *et al.* [118]. Les membres de la tribu sont facilement reconnues par les pigments rouge-brun du type mélanine qu'ils forment lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions aérobies sur un milieu contenant du fer et un acide aminé aromatique, tel que le phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine ou l'histidine [119, 120].

En outre, la plupart des souches du groupe *PMP* partagent les caractéristiques communes suivantes: la mobilité avec des flagelles péritriches, la résistance aux KCN

(cyanure de potassium) (sauf *Providencia heimbachae.*), La capacité de dégradation de la tyrosine (sauf *Proteus myxofaciens*) [121] et une incapacité à acidifier le lactose, le dulcitol, et du malonate ou bien à former l'arginine dihydrolase, β -galactosidase ou la lysine decarboxylase (à l'exception de certaines souches de *M. morganii*). Tous sont rouge de méthyle positif et, sauf pour certaines souches de *Proteus spp.*, sont Voges Proskauer-négatif.

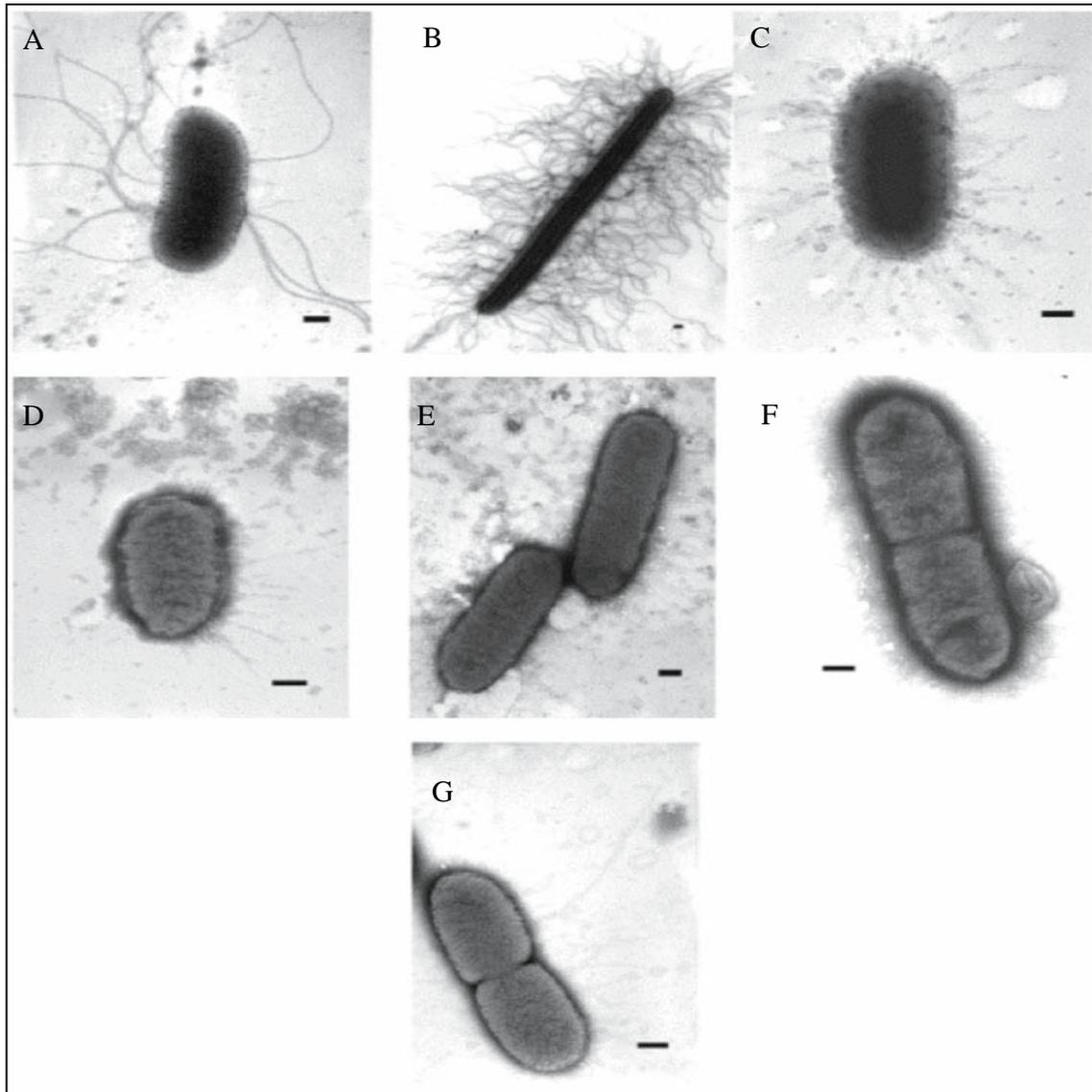


Figure 6. Les micrographies électroniques des espèces appartenant aux genres *Proteus*, *Morganella* and *Providencia*. (A, B) *Proteus mirabilis* cellule nageur; (C) *P. vulgaris*; (D) *P. penneri*; (E) *M. morganii*; (F) *Providencia stuartii* and (G) *P. rettgeri*. La barre représente 200 nm [5].

Tableau 6. Différenciation des trios genres de *PMP* [117].

Test	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Morganella</i>
Utilisation de citrate	V	+	-
Fermentation de D-Mannose	-	+	+
Production de H ₂ S	+	-	V
Ornithine decarboxylase	V	-	(+)
Hydrolysis d'urée	+	V	+
Fermentation d'inositol	-	V	-
Liquéfactions de gélatine (22°C)	+	-	-
Lipase (huile de maïs)	+	-	-
Essaimage	+	-	-

+ : 90–100% positive; (+) : 75–89.9% positive; V : 25.1–74.9% positive; - : 10.1–25% positive.

2. Le genre *Proteus*

2.1. Taxonomie et phylogénie

Le genre *Proteus* fut créé en 1885 par Gustav Hauser [122]. C'est par analogie à Protée, Dieu de l'océan dans la mythologie grec, qui avait le pouvoir de changer de forme à volonté, que Hauser a donné le nom à cette bactérie qui se caractérise par l'envahissement de la gélose.

La classification des bactéries du genre *Proteus* a changé au cours du XXe siècle. En raison de la forte similitude entre les 3 genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia*. Les deux premières espèces *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* ont été initialement décrites par Hauser. En 1966, Cosenza et Podgwaite [123] ont isolés, à partir de larves de la spongieuse, des bactéries biochimiquement distincte des deux espèces *P. mirabilis* et *P. vulgaris*. Ces auteurs ont proposé de nommer ces bactéries *Proteus myxofaciens*. Les tests biochimiques ainsi que l'hybridation ADN-ADN ont montré l'homogénéité de l'espèce *P. mirabilis* et l'hétérogénéité de l'espèce *P. vulgaris*. Hickmann *et al.* [124] ont divisé *P. vulgaris* en trois biogroupes basées sur la production d'indole, l'hydrolyse de l'esculine et la fermentation de la

salicine. Le biogroupe 1, également défini comme genomospecies 1, était indole, salicine, et esculine négatif et a été nommé *Proteus penneri*. Ensuite, les deux biogroupes supplémentaires de *P. vulgaris* (2 et 3) ont été étudiés. Les résultats des études ont suggéré que biogroup 2 était homogène et représentaient une seule espèce [125] dont le nom *P. vulgaris* a été réaffecté à cette espèce [4]. Tandis que le biogroup 3 est composé de quatre genomospecies (3, 4, 5, et 6). Les études d'O'Hara *et al.* [125] ont montré que le genomospecies 3 ne contenait que deux souches présentant une faible parenté avec d'autres genomospecies de *P. vulgaris* et possédants des caractéristiques biochimiques uniques (ADNase, lipase, et tartrate négatif). Ces résultats ont permis aux auteurs de séparer le genomospecies 3 des autres genomospecies ainsi que de proposer qu'il devrait être nommé *Proteus hauseri*, tandis que les autres genomospecies sont restés sans nom comme *Proteus* genomospecies 4, 5, et 6. Ainsi, le genre *Proteus* se compose actuellement de cinq espèces, différenciées par les tests biochimiques indiqués dans le tableau 2, *P. mirabilis* (souches type ATCC 29906), *P. vulgaris* (ATCC 29905), *P. penneri* (ATCC 33519), *P. hauseri* (ATCC 700826 et ATCC 13315) *P. myxofaciens* (ATCC 19692), ainsi que les trois *Proteus* genomospecies anonymes. *Proteus* genomospecies 4 (ATCC 51469), 5 (ATCC 51470) et 6 (ATCC 51471) [4, 126]. *P. myxofaciens* est la seule espèce *Proteus* sans importance dans la pathogénicité des êtres humains [126]. Récemment, les résultats de l'analyse de séquences partielles du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN-polymérase, a conduit à la conclusion qu'il existe une distance génétique entre l'espèce *P. myxofaciens* et les autres espèces du groupe *Proteus-Providencia*. Une nouvelle classification de *P. myxofaciens* dans un nouveau genre *Cosenzaea gen. Nov.* a donc été proposé [127].

Tableau 7. Différenciation biochimique au sein du genre *Proteus* [117].

Test/Propriétés	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. penneri</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>P. myxofaciens</i>
Production d'indole	-	+	-	+	-
Ornithine décarboxylase	+	-	-	-	-
Fermentation de maltose	-	+	+	+	+
Fermentation de salicin	-	+	-	-	-
Fermentation de D-Xylose	+	+	+	+	-
Hydrolysis de l'esculine	-	+	-	-	-
Sensibilité au Chloramphenicol	S	V	R	S	S

+: 90–100% positive; - : 0–9.9% positive; S: sensible; R: résistant; V: variable.

2.2. Habitat et pathogénicité

Les *Proteus* sont largement distribués dans l'environnement naturel, y compris l'eau pollué, le sol et le fumier. En raison de leur activité protéolytique, leur capacité d'hydrolyser l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone, ainsi que de la désamination oxydative des acides aminés, ces bactéries sont impliquées dans la décomposition de la matière organique d'origine animale. Ils sont également présents dans les intestins des êtres humains et des animaux. Par conséquent, ils sont souvent isolés de matières fécales humaines et animales, ainsi que des sources associées telles que les eaux usées et de la viande en décomposition [126]. *P. mirabilis* a été le plus souvent isolé des chiens, des vaches et des oiseaux, alors que *P. vulgaris* a été le plus souvent isolé chez les porcs et les vertébrés à sang froid [128].

Les *Proteus* sont des pathogènes opportunistes, provoquant différents types d'infections, y compris les infections de plaies, la méningite du nouveau-né ou des nourrissons, la

polyarthrite rhumatoïde (PR) et la gastro-entérite, cependant, ces bactéries sont rarement associés aux infections d'origine alimentaire [126]. Ils peuvent également coloniser le tractus urinaire, dans certaines circonstances, où il est considéré comme un pathogène opportuniste et l'une des principales causes des infections des voies urinaires (UTI) chez les patients hospitalisés avec sondes urinaires [5] ou à des anomalies structurelles et / ou fonctionnelles au niveau des voies urinaires, comme après une intervention chirurgicale dans le système génito-urinaire. *P. mirabilis* provoque une infection urinaire avec la fréquence la plus élevée parmi toutes les espèces de *Proteus*. Il est impliqué dans les infections compliquées et les infections chez les patients cathétérisés pendant une longue durée. Les *Proteus* sont souvent associés aux infections nosocomiales et peuvent causer deux types d'infections urinaires, les infections hémotogènes et les infections ascendantes, cependant, ces dernières sont les plus causées par ces micro-organismes [126, 129].

Il n'y a pas de fortes preuves pour classer les *Proteus* comme entéropathogènes. Le rôle possible des *Proteus* dans les maladies diarrhéiques a été étudié dans les années 50s [130]. Muller *et al.* [131, 132] ont trouvé des souches de *P. mirabilis* et *P. vulgaris* dans les échantillons diarrhéiques et ces espèces ont été le plus souvent isolées à partir de patients atteints de maladies diarrhéiques que des personnes en bonne santé. Il n'y a pas de preuve que des souches de *Proteus* classées en différents sérogroupes pourraient lancer une épidémie de maladies entériques.

Les *Proteus* ont également été isolés à partir de produits alimentaires tels que les saucisses fabriquées et emballées sous vide [117], les poissons d'eau douce et d'eau salée, dont la consommation de poisson contaminé conduit à la maladie connue sous le nom de scombroidose [117, 133]. Récemment les souches de *P. mirabilis* ont été retrouvées accumulées dans les huîtres recueillies de la zone côtière du Venezuela [134]. La présence de ces bactéries peut être attribuée à une contamination fécale de cette zone, en particulier durant les périodes pluvieuses. En plus *Proteus spp.* a été identifiée dans les échantillons de lait cru acheté illégalement dans deux grandes villes du Ghana indiquant la contamination fécale du lait due à une mauvaise hygiène [135]. D'autres études récemment ont montré que les souches de *P. vulgaris* présentes à la surface des fromages français mûrs avaient la plus grande capacité

à produire des quantités élevées et de grandes variétés de composés volatils, qui jouent un rôle majeur dans la formation de l'arôme du fromage [136].

2.3. Facteurs de virulence (figure 7)

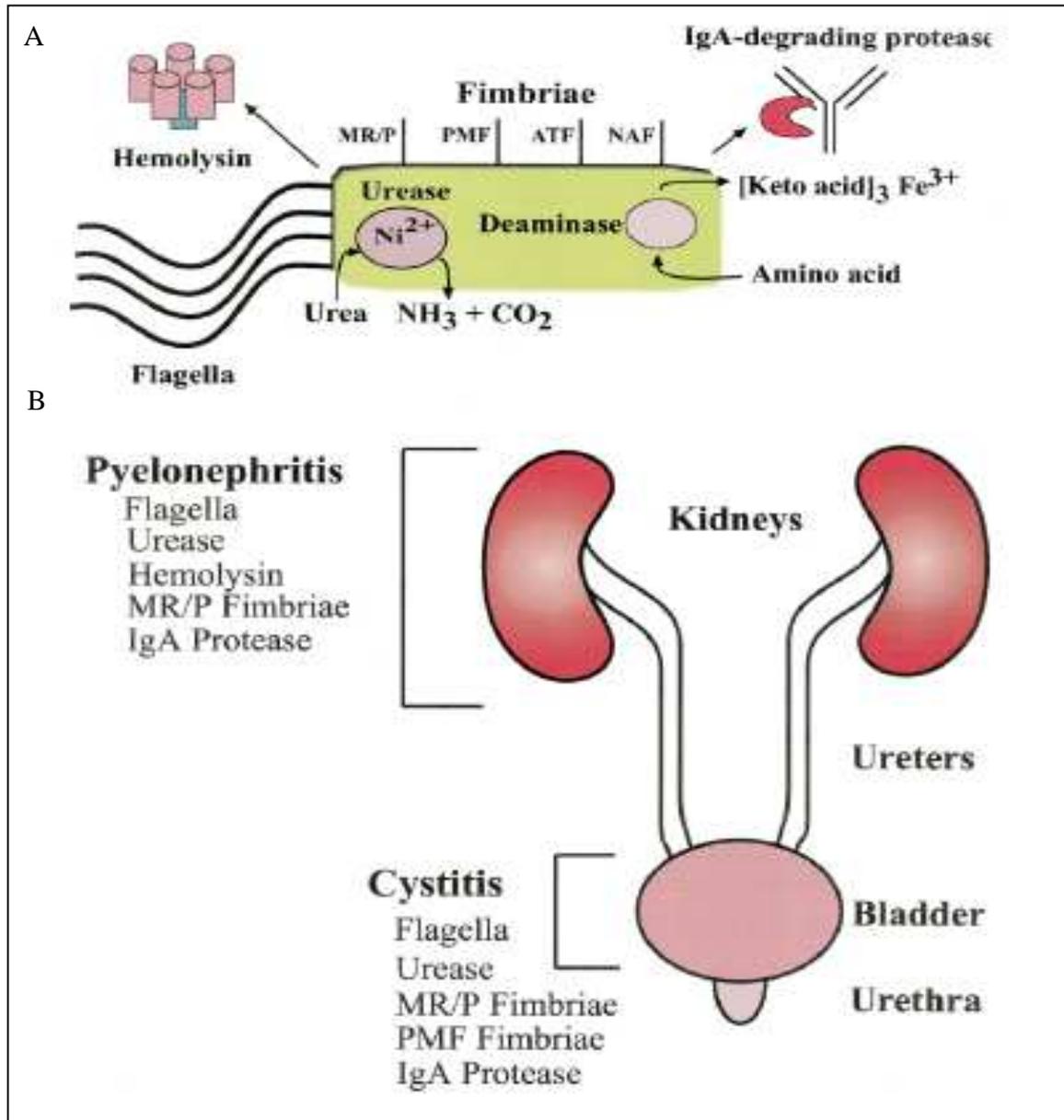


Figure 7. Facteurs de virulence produits par *P. mirabilis* (A) et les sites d'action possibles lors de l'UTI (B) [137].

2.3.1. Uréase

L'activité d'uréase a été décrite dans plus de 200 bactéries, y compris celles retrouvées dans les infections urinaires, cependant, *E. coli* ne présente pas d'activité d'uréase, tandis que *P. mirabilis* la possède [138, 139]. L'enzyme de l'uréase est composée de trimères en UreA, UreB, ureC et un co-enzyme de nickel [139, 140]. Lors d'un contact avec l'urée, l'uréase provoque la décomposition de ce dernier en ammoniac et en dioxyde de carbone [141]. L'ammoniac augmente le pH et provoque la précipitation des minéraux, ce qui peut conduire à des calculs de la vessie et du rein, ainsi que la formation de biofilms cristallins le long d'un cathéter [142, 143]. *P. mirabilis* est particulièrement apte à former ces biofilms en raison de leur capsule, qui non seulement aide à l'adhérence des cellules, mais aussi dans la formation de structures en cristal [144, 145]. Ces cristaux ont un effet sur la virulence de *P. mirabilis* de multiples façons. Tout d'abord, l'augmentation de l'ammoniac peut provoquer la lyse des cellules hôte ce qui conduit en une augmentation de nutriments pour les bactéries [137]. Deuxièmement, les cristaux vont créer un refuge pour les bactéries de se cacher et d'échapper non seulement des cellules immunitaires, mais également des antibiotiques [137, 146]. Les calculs rénaux / urinaires et les biofilms cristallins sur cathéters peuvent bloquer le flux de l'urine dans les uretères et peuvent être la cause des problèmes plus graves telles que la pyélonéphrite et éventuellement la septicémie [147]. Au cours d'une infection l'activité de l'uréase est très importante. Des études ont montré que lorsque les gènes de structure de l'enzyme sont mutés; il ya un grand désavantage concurrentiel [148, 149]. Quand on introduit des mutations dans l'un des gènes de l'uréase, *P. mirabilis* ne parvient pas à coloniser la vessie ou les reins tel que le bactérie sauvage [149].

2.3.2. IgA Protéase

Il y a quelques bactéries ainsi que *P. mirabilis* qui peuvent produire une enzyme extracellulaire capable de cliver l'IgA. Il s'agit notamment de la *Neisseria*, *Haemophilus influenza*, et *Streptococcus pneumoniae*, qui causent des infections à muqueuses [150]. La protéase produite par *P. mirabilis* est une métalloprotéase de la famille de serralysin de protéase de zinc, codés par zapA [151]. Le pH alcalin est optimal pour l'activité d'un grand nombre de ces types de protéases, ce qui est souvent présent en raison de l'activité de l'uréase

de *P. mirabilis* (voir ci-dessus) [152]. Contrairement à la plupart des protéases IgA, qui ne clivent que la région charnière de l'IgA, zapA le dégrade complètement [153, 154]. Il a été également montré, *in vitro*, que zapA est en mesure de cliver de nombreuses autres protéines présentes dans le tractus urinaire, comprenant: des composants du complément, des éléments du cytosquelette, et les peptides antimicrobiens [155]. Au cours de l'infection, zapA est produit et actif, ce qui provoque la dégradation de l'IgA *in vivo* [153]. Il a été également montré que zapA est nécessaire pour UTI dans le modèle des infections ascendantes [156]. Lorsque zapA est muté, le nombre de bactéries récupérées est spécifiquement diminué dans l'urine et la vessie, avec une diminution d'un facteur 100 000 et 10 000, respectivement [156].

2.3.3. Hémolysine

Activité hémolytique est communément retrouvée chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives. *P. mirabilis* présente une activité hémolytique codée par les gènes hpmAB [157]. HpmA est une toxine indépendante du calcium, elle est à la fois activé par le clivage de son extrémité N-terminale et transportées par HpmB [157, 158]. La fonction de l'hémolysine est de former des pores dans les cellules hôtes cibles, ce qui permet au *P. mirabilis* de propager dans les reins lors de l'infection [137]. Ceci est probablement médiée par la capacité accrue des cellules hémolytiques de *P. mirabilis* à envahir les tissus de l'hôte [159, 160].

L'hémolysine n'est pas aussi critique pour l'infection tel que l'uréase, cependant, comme pour l'uréase et IgA protéase, il est surexprimé dans les cellules nageuses [161, 162]. Dans le modèle des infections urinaires ascendantes, aucune différence n'est observée entre les cellules de type sauvage ou un mutant hpmA pendant la colonisation du tractus urinaire [163]. Cependant, la même étude a également montré que lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, la dose létale pour les mutants hémolytiques est six fois plus élevée que le type sauvage, ce qui indique que l'activité hémolytique peut jouer un rôle dans la pathogenèse sous certaines conditions [163]. Autre étude indique également que les souches qui n'ont pas une activité hémolytique sont moins virulentes [164].

2.3.4. Agglutinine toxique de *Proteus*

Une toxine récemment découvert, la Pta, produite par *P. mirabilis* est à la fois cytotoxiques et possédant la capacité d'agglutination [165, 166]. La Pta est une protéine calcium dépendante qui reste à la surface de la cellule. L'activité cytotoxique est liée au Pta quand elle est associée à une cellule ou dans une forme purifiée [166]. Il a été montré que la Pta est exprimée in vivo au cours d'une infection, et que les bactéries dépourvues de Pta ont des symptômes de la maladie moins graves dans les reins [165]. Ces données suggèrent le rôle important de Pta dans la pathogenèse de *P. mirabilis*.

2.3.5. Flagelles et essaimage

La mobilité des *Proteus sp.* s'effectue soit par le mécanisme classique de la nage soit par essaimage. La nage est observée après culture dans un milieu liquide. Les bactéries se présentent alors sous la forme de courts bacilles (de 1,0 à 3,0 µm) pourvus de 6 à 10 flagelles.

L'essaimage (ou "swarming") est une alternative à la nage observée lorsque les bactéries sont cultivées en milieu solide. Ensemencées au centre d'une boîte de milieu gélosé, les bactéries se multiplient pour donner une colonie. Lorsque le milieu s'épuise, on voit apparaître des formes longues, fortement mobiles, aptes à se déplacer à la surface du milieu afin de coloniser un endroit de la gélose riche en nutriments. Elles donnent alors naissance à des formes courtes et faiblement mobiles mais, l'appauvrissement progressif du milieu provoquera à nouveau l'apparition de formes longues qui repartiront vers des zones de milieu neuf. Ces cycles périodiques de migration, dus à la transcription d'une série de gènes (40 à 60 gènes seraient impliqués) se traduisent par la formation de halos de culture concentriques (figure 8) [117, 167, 168]. L'essaimage nécessite une véritable transformation des bactéries. Les cellules s'allongent (la longueur peut atteindre 80 µm), elles deviennent polyploïdes (par exemple, les formes de 40 µm de longueur contiennent environ 20 chromosomes), leur membrane externe devient plus fluide, le LPS possède des chaînes latérales plus longues, la synthèse d'uréase, de protéase et d'hémolysine extracellulaire augmente et elles sont pourvues d'une abondante ciliature (plusieurs centaines à plusieurs milliers de flagelles) [168].

L'essaimage est un phénomène collectif et coordonné car une cellule isolée est incapable d'essaimer à la surface d'une gélose. L'induction de l'essaimage est déclenchée par des facteurs inhibant la rotation des flagelles (telle que l'augmentation de viscosité du milieu) et par la présence de signaux extracellulaires. De ce point de vue, la glutamine semble jouer un rôle très important. En effet, dans un milieu minimum, la glutamine est le seul acide aminé capable d'initier la transformation en formes longues pourvues d'une abondante ciliature. Des mutants incapables de coder pour le système de transport de la glutamine ont un comportement analogue aux souches sauvages ce qui montre que l'induction par la glutamine est indépendante du système de transport de cet acide aminé. En fait, il semble que les flagelles se comportent comme des structures aptes à analyser les conditions du milieu ambiant et à transmettre des signaux à la cellule [167].

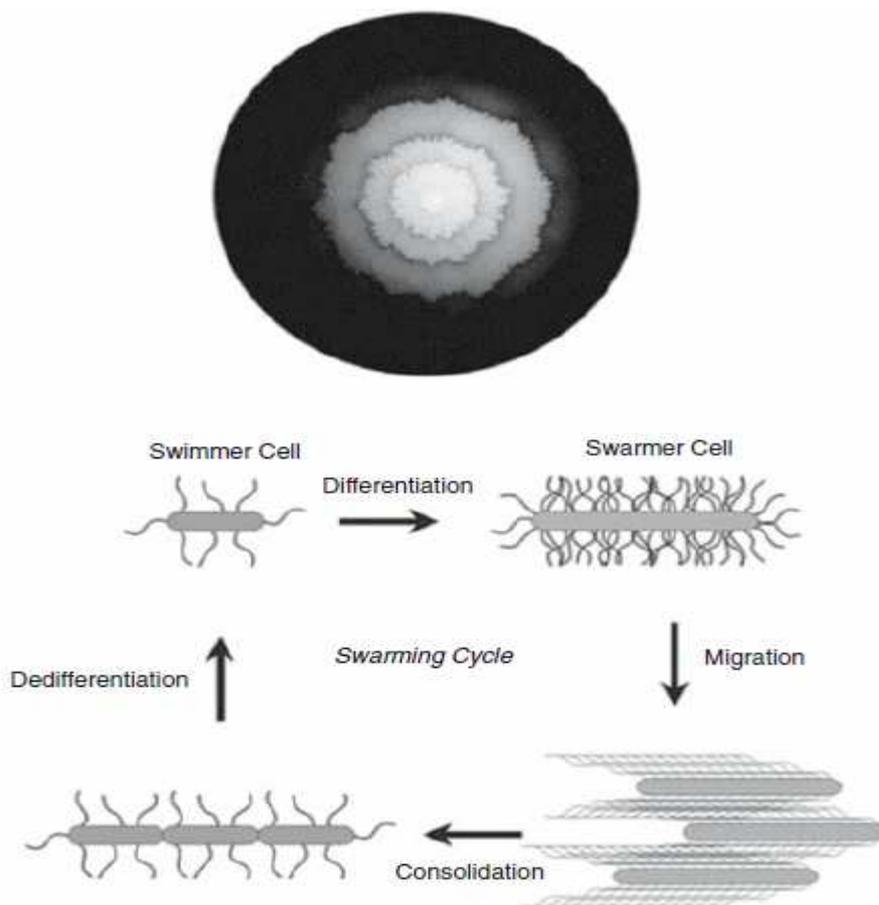


Figure 8. La nature cyclique de souche de *P. mirabilis* présentant le comportement d'essaimage [5].

Les capacités à essaimer sont variables selon les espèces et les souches. L'essaimage est peu marqué pour *P. penneri* et il peut ne pas exister avec certaines souches de *P. mirabilis* ou de *P. vulgaris* qui forment alors soit un voile continu (envahissement continu sans périodicité) soit des colonies parfaitement circonscrites (absence totale d'envahissement) [117].

L'analyse génétique, couplée avec des données de pathologie et de colonisation, ne fournit pas une réponse définitive sur le rôle de l'essaimage au cours de l'infection [137, 169]. Allison *et al.* ont utilisé deux modèles d'infection différentes pour étudier les effets de l'essaimage au cours de l'infection. En utilisant un mutant mobile sans essaimage, par rapport à une souche mobile avec essaimage, ils ont montré au cours d'une infection systémique que les souches mutantes causent moins d'abcès rénal que les bactéries de type sauvage [169]. Ces données semblent indiquer que l'essaimage est important lors de l'infection. D'autre part, Zunino *et al.* ont démontré qu'un isolât clinique non flagellé avait le même pouvoir infectieux que les isolats cliniques flagellés dans les infections urinaires ascendante et hématogène [170]. Cela suggère que les flagelles et donc l'essaimage ne sont pas nécessaires pour l'infection.

2.3.6. Fimbriae

Les fimbriae sont des appendices de surface bactérienne utilisée pour l'adhésion. Le séquençage récent du génome de *P. mirabilis* a révélé qu'il ya 17 opérons fimbriaux différents, couvrant 5 classes différentes de fimbriae [171]. Seuls quelques-uns d'entre eux ont été impliqués dans la virulence. Les fimbriae sont normalement exprimé à l'inverse de flagelles, indiquant l'adhésion et la motilité et sont nécessaires à différents étapes de la vie et du cycle infectieux de. Il a été démontré que l'opéron MR/P (mannose-resistant Proteus-like fimbriae) code pour la protéine, MrpJ, qui peut réprimer l'expression des flagelles pendant l'expression des fimbriae [172-174].

Les fimbriae MR/P sont des fimbriae de 7 nm de diamètre et sont probablement les fimbriae de *Proteus* les mieux étudiés, ils sont responsables d'une hémagglutination non inhibée par le mannose. Les mutants *mrpJ* colonisent mal le tractus urinaire et provoquent des infections urinaires moins graves que les souches parentales. Les fimbriae MR/P sont fréquemment synthétisées par les souches de *P. mirabilis* mais rarement par les souches de *P. penneri* [175, 176].

Les fimbriae MR/K sont semblables aux fimbriae mannose-résistante des *Klebsiella sp.* d'où leur nom de mannose-resistant *Klebsiella-like*. Ce sont des fimbriae de 4 nm de diamètre, constituées principalement par une protéine de 19,5 kDa et responsables d'une hémagglutination (à condition d'utiliser des globules rouges tannés). Les fimbriae MR/K sont fréquemment présentes chez les souches de *Proteus penneri* mais on les trouve également chez *Proteus mirabilis*. Les souches aptes à synthétiser les fimbriae MR/K se caractérisent par une forte adhésion aux cathéters et elles sont souvent responsables d'infections consécutives à la pose de cathéters [177].

Les fimbriae PMF, pour *Proteus mirabilis* fimbriae, sont codées par le gène pmf. Les mutants pmf n'expriment plus une protéine de 18,9 kDa, ils sont aptes à coloniser les reins mais inaptes à coloniser efficacement la vessie [178].

Les protéines UCA (uroepithelial cell adhesin) sont en fait des fimbriae de 4 nm de diamètre qui permettent un attachement aux cellules épithéliales de l'appareil urinaire. La fraction responsable de l'adhésion est une protéine de 17,5 kDa dont la séquence N-terminale présente des homologies avec celle des fimbriae d'*Escherichia coli* et notamment avec K99. Les protéines UCA également dénommées NAF (nonagglutinating fimbriae) n'ont été identifiées que chez *Proteus mirabilis* [179-181]

Les fimbriae appelées *Proteus mirabilis* P-like fimbriae ont été identifiées uniquement chez des souches de *Proteus mirabilis*. La protéine constitutive de ces fimbriae présente de fortes homologies avec les fimbriae Pap (pyelonephritis-associated fimbriae) présentes chez des souches uropathogènes d'*Escherichia coli*.

2.4. Sensibilité aux antibiotiques

Les souches de *P. mirabilis* indole-négatif sont généralement plus sensibles aux antibiotiques que celles de *P. vulgaris*, *P. penneri*, et *P. hauseri*. *P. mirabilis* a une résistance intrinsèque à la nitrofurantoïne et la tétracycline, mais généralement il est sensible aux amino et uréido-pénicillines (ampicilline, amoxicilline, pipéracilline), aux céphalosporines (céfazoline, céfoxitine, céfuroxime, céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ceftizoxime, et céfépime), aux aminosides (amikacine, gentamicine et tobramycine), imipénème,

ciprofloxacine, et triméthoprime-sulfaméthoxazole [182-185]. Toutefois, des niveaux élevés de résistance à la ciprofloxacine ont été signalés pour *P. mirabilis* et *Providencia* dans les hôpitaux où l'utilisation de cet agent est libre [186]. La résistance intrinsèque à la tétracycline peut être utilisée comme un marqueur d'identification de ce micro-organisme.

En 1979, Chow *et al.* ont signalé une émergence de *P. mirabilis* résistant à l'ampicilline, à la céphalothine, la tétracycline, le chloramphénicol, la carbénicilline, la colistine, triméthoprime-sulfaméthoxazole, la streptomycine, et les aminosides [187]. Une épidémie de *P. mirabilis* résistant à la fois à la gentamicine et à l'antiseptique chlorhexidine, ainsi que sept autres agents antimicrobiens, a été signalée comme étant la cause des infections des voies urinaires chez 90 patients en Angleterre en 1987 [188]. Lors d'une épidémie inhabituelle dans une pouponnière de l'hôpital, la souche de *P. mirabilis* qui était responsable de bactériémies et méningites des nouveau-nés était sensible à la tétracycline. Ce modèle antimicrobien très inhabituel a été utilisé comme marqueur de retracer l'épidémiologie [189].

P. penneri est généralement plus résistants à la pénicilline que *P. vulgaris*, et son profil de sensibilité reflète plus fidèlement celui de *M. morgani* que celui de *P. vulgaris*. Ces *Proteae* sont généralement sensibles à la céfoxitine, aux céphalosporines à large spectre (céfotaxime, ceftriaxone, ceftizoxime et ceftazidime), la céfépime, l'aztréonam, aux aminosides, la ciprofloxacine, le tazobactam et l'imipénème [182, 185] et peut être résistant à la céfazoline, cefprozil, céfuroxime, céfamandole, cefdinir, cefoperazone, loracarbef, l'ampicilline, et les uréidopénicillines [190]. Dans une étude en 1996, Fuchs *et al.* ont indiqué que la différence entre les tests de résistance aux antibiotiques par diffusion de disques et par microdilution de bouillon de *P. vulgaris* a été remarquable [182]. Dans cette étude, 100% des 25 isolats de *P. vulgaris* étaient sensibles à quatre céphalosporines à large spectre par diffusion en milieu gélosé, mais seulement 64 et 40% étaient sensibles à la céfotaxime et la ceftriaxone, respectivement, par microdilution en bouillon.

3. Le genre *Morganella*

3.1. Habitat et écologie

Le genre *Morganella* se compose actuellement d'une seule espèce, *Morganella morganii*, avec deux sous-espèces, *morganii* et *sibonii* [4]. C'est un organisme commensal qui peut rapidement coloniser l'intestin de l'hôte avec l'accompagnement d'une hypertrophie des plaques de Peyer et le développement de réponses d'IgA spécifiques dans les cellules de la lamina propria [191]. Les souches de *M. morganii* sont également connues pour infecter le tractus urinaire humain, le système respiratoire et le sang, mais ils ont seulement été parfois récupérés à partir de ces sources [192].

M. morganii se produit en faible nombre dans les matières fécales des humains et des animaux en bonne santé, y compris les chiens, les bovins et les poulets [128, 193-195]. Son habitat est peut-être beaucoup plus varié, il a été isolé à partir de serpents, poulets souffrant de maladies respiratoires et des lésions oculaires de phoques et éléphants de mer [196-198]. Il est difficile de savoir si *M. morganii* était l'agent causal dans ces maladies ou un colonisateur opportuniste des tissus déjà malades.

3.2. Pathogénicité

Bien que le rôle étiologique de *M. morganii* dans la diarrhée n'a pas encore été clairement établi, il est constamment récupéré à partir des fèces de patients diarrhéiques suggérant une implication dans la maladie. En outre, certains chercheurs ont constaté que *M. morganii* est la seule espèce bactérienne potentiellement pathogène dans les selles de patients diarrhéiques, renforçant ainsi sa prétention à être la cause de la maladie dans ces cas [199].

En dépit de l'implication de *M. morganii* dans les maladies diarrhéiques, cette espèce est moins susceptible d'être l'agent causal de l'UTI humaine que *P. mirabilis*. Ceci est principalement dû à la faible vitesse de croissance de *M. morganii* dans l'urine par rapport à celle de *P. mirabilis* et la nature de son uréase non inductible [200]. Bien que n'étant pas un contributeur majeur à l'UTI humaine, *M. morganii* a été impliqué dans des épidémies de septicémie et de bactériémie chez les humains et les animaux [201-206]. La bactériémie causée par *M. morganii* survient le plus souvent chez les patients qui reçoivent une

antibiothérapie postopératoire à base de β -lactamines. McDermott et Mylotte [204] ont étudié l'histoire de 19 cas documentés de bactériémies causées par *M. morganii* chez des patients hospitalisés et ont montré que la majorité des infections étaient soit postopératoire ou avait des lésions associées de la plaie. Ils ont conclu que *M. morganii* est une rare cause de bactériémie et sa présence dans les cultures de sang peut être un indicateur d'un environnement, comme la chirurgie, qui est conduire à une épidémie d'infection nosocomiale.

3.3. Facteurs de virulence

Il y a très peu d'informations sur les facteurs de virulence impliqués dans la pathogénèse de *M. morganii*. Malgré la rareté des rapports, les facteurs de virulence les plus importants sont décrits ci-dessous, mais il convient de noter que les données détaillant l'efficacité de chaque facteur de virulence peuvent être minimales ou pas aussi importantes que celles des facteurs de virulence de *P. mirabilis*, par exemple.

3.3.1. Hémolysine

La synthèse de l'hémolysine intracellulaire actif [207] par *M. morganii* suit une tendance similaire à celle observée avec les hémolysines de *E. coli*, *P. mirabilis* et *P. vulgaris*. Emody *et al.* [208] ont mesuré la virulence des souches de *M. morganii* due à l'hémolysine. Les souches sauvages Hly (+) et les transconjugants Hly (+) ont été trouvés plus virulents que les souches Hly (-) chez les souris et les embryons de poulet. Cette virulence accrue semble être liée à la production d'une α -hémolysine diffusible. Il y a une différence importante entre les hémolysines de *M. morganii* et ceux de *P. mirabilis* et *P. vulgaris*. Koronakis *et al.* [209] ont constaté que l'activité hémolytique dans toutes les souches testées de *M. morganii* était extracellulaire, alors que dans toutes les souches de *P. mirabilis* et 60% de souches de *P. vulgaris*, l'hémolysine n'a été trouvée que associée avec des cellules intactes. La présence du gène sécrétoire *hlyD* chez *M. morganii*, peut expliquer la différence dans les profils de sécrétion observés dans ces deux genres.

3.3.2. Uréase

Bien que tous les deux *P. mirabilis* et *M. morganii* possèdent une activité d'uréase avec quelques similitudes, il existe également des différences significatives entre les enzymes qui peuvent jouer un rôle dans le choix de l'habitat et de la pathogénicité. Par exemple, l'uréase de *M. morganii* possède une affinité plus élevée pour l'urée que l'uréase de *P. mirabilis*, mais ce dernier hydrolyse l'urée à un taux de 6 à 25 fois plus rapide [210]. *M. morganii* survit dans des conditions acides et ses uréases se sont révélés être activés in vitro par un pH bas, avec une activité exceptionnellement optimale dans pH 5,5 [211]. A cet égard, l'uréase de *M. morganii* est similaire à l'uréase de *Y. enterocolitica* et *H. pylori*, les deux pouvant hydrolyser l'urée à des taux significativement plus élevés dans des conditions acides par rapport aux autres bactéries pathogènes. Cette étude est une évaluation critique de savoir si l'uréase de *M. morganii* est un facteur important dans la pathogénèse de cette espèce finira par exiger des études in vivo avec des mutants uréase-négatif.

3.4. Sensibilité aux antibiotiques

Les souches de *M. morganii* sont sensibles à de nombreux agents antimicrobiens actuellement utilisés, y compris la ceftazidime, la céfépime, l'aztréonam, l'imipénème, la tazobactam, la ciprofloxacine, la tobramycine et la gentamicine. Tandis qu'elles sont souvent résistantes aux céphalosporines récents, y compris cefprozil, céfuroxime, loracarbef, Céfдинир, et céfetamet [212]. Elles peuvent également être résistantes à la céfazoline, céfixime, céfpodoxime et l'ampicilline.

Comme avec les souches de *Providencia spp.*, *Morganella*. sont capables de produire les β -lactamases. Lorsque les tests de sensibilité automatique sont effectués sur ces organismes, un cadre de 3 à 6 h de temps ne peut pas être suffisant pour l'expression de tous les mécanismes de résistance bactérienne et pourrait déboucher sur un rapport de fausse sensibilité [213]. La fausse résistance peut également se produire dans les tests avec l'aztréonam grâce à l'élongation des cellules au cours de la croissance juste avant la lyse [214]. York *et al.* ont étudié l'incapacité de plaques de sensibilité rapides MicroScan Walk/Away

pour la détection de la résistance au céphalosporines à large spectre chez les souches de *Morganella* et de *Proteus* indole-positif [215].

4. Le genre *Providencia*

4.1. Taxonomie et phylogénie

En 1962, Ewing a formellement proposé d'établir le genre *Providencia* incluant différentes souches et biogroupes auparavant classés dans le groupe Providence. Deux espèces ont été reconnues, à savoir, *P. alcalifaciens* (anciennement Providence sous-groupe A) et *P. stuartii* (Providence sous-groupe B) [216]. En 1978, Brenner *et al.* [217] ont fourni une évaluation taxonomique détaillée des membres actuels des genres *Proteus* et *Providencia* en utilisant la cinétique de réassociation d'ADN. La principale conclusion de cette étude était que trois espèces devraient être reconnus dans le genre *Providencia*, à savoir *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, et *P. rettgeri*. Cette étude a également révélé que le biogroup précédente de *P. alcalifaciens* représenté une nouvelle espèce mais non encore nommés. En 1983, une proposition formelle pour remplacer *P. alcalifaciens* biogroup 3 par *P. rustigianii* a été faite par Hickman-Brenner *et al.* [218]. Cette étude a été suivie 4 mois plu tard par une autre réalisé par Muller [219] qui a décrit une nouvelle espèce de *Providencia*, *P. friedericiana* isolée à partir de 5 espèces différentes de pingouin résidants dans un zoo en Allemagne. En 1986, une cinquième espèce taxonomiquement définis de *Providencia*, *Providencia heimbachae*, a été décrite par Muller 1986 [220] qui il a isolé à partir des fèces de pingouin et d'un fœtus bovin avorté. Une souche de cette espèce a été récemment isolé à partir de l'homme, en particulier, les selles d'un patient atteint de diarrhée idiopathique [221]. Il convient de noter, cependant, que cette souche possède des différences biochimiques et physiologiques importantes par rapport à la souche type de Muller. Bien que la souche type est positif pour la phénylalanine désaminase, la production de gaz à partir du glucose et de maltose et la fermentation de mannitol, l'isolât humain est négative pour ces tests. En outre, la motilité n'est observée qu'après 6 jours chez l'isolât humain, comparativement à 4 jours pour la souche type.

4.2. Habitat et écologie

Les espèces du genre *Providencia* sont toutes anaérobies facultatives et mobiles par flagelles péritriches (figures 6 F, G.). Cependant, ils ne présentent pas la différenciation cellulaire et le comportement d'essaimage. La production d'uréase n'est pas caractéristique de toutes les espèces de *Providencia*, avec seulement les souches de *P. rettgeri* qui le produisent [217].

P. stuartii se trouve le plus souvent chez les patients hospitalisés atteints d'infections des voies urinaires. Les résultats des études de patients cathétérisés pendant de longues périodes indiquent que *P. stuartii* peuvent souvent être trouvées sur des surfaces de cathéter aussi souvent que des souches uropathogènes plus familiers tels que *E. coli*, *P. mirabilis*, *Enterococcus sp.*, et *P. aeruginosa* [222]. Il a été également isolé à partir des plaies, des brûlures et des bactériémies, qui indique en outre la pathogénicité de cette espèce [223]. Cependant, il se trouve, moins fréquemment, dans les infections respiratoires, du tractus gastro-intestinal et de la peau [222, 224]. *P. rettgeri* a de même émergé ces dernières années comme un pathogène nosocomial important. Cette espèce a été isolée régulièrement de l'appareil urinaire des patients cathétérisés ou immunodéprimés et moins fréquemment de matières fécales humaines, de la bile et des expectorations [225-228]. Parmi les autres espèces, *P. alcalifaciens* est un colonisateur intestinal et une cause reconnue de gastro-entérite, il est généralement isolés à partir d'échantillons de selles avec d'autres agents pathogènes entériques [229]. *P. rustigianii* a été isolé à partir de multiples sources humaines et animales, y compris (bizarrement) les excréments de manchots [219, 230]. Il a également été confirmé comme un habitant de tractus gastro-intestinal et est souvent trouvé dans le tractus intestinal des mammifères, tels que les humains et les porcs, et même dans chez celui des oiseaux de l'Arctique, par exemple, des pingouins. Bien que cette espèce peut coloniser le tractus gastro-intestinal humain et certaines des sources inclus des patients diarrhéiques, mais aucun lien direct avec la diarrhée a été établi. Le véritable niche écologique habité par *P. heimbachae* n'a pas encore été déterminée, mais les preuves existantes suggèrent qu'il peut habiter le tractus gastro-intestinal, comme cela est courant pour les autres espèces de *Providencia* [221, 230, 231].

4.3. Pathogénicité

Les espèces de *Providencia* qui ont été clairement identifiées comme des agents pathogènes sont *P. stuartii*, *P. rettgeri* et *P. alcalifaciens*. Dans la pathogénèse humaine, le membre le plus important du genre est *P. stuartii*, alors que la virulence de *P. rettgeri* et *P. alcalifaciens* est moins claire. *P. stuartii*, ainsi que *P. mirabilis* et *M. morganii*, est particulièrement efficace dans la colonisation des cathéters urinaires augmentant ainsi leur capacité à provoquer une bactériurie ultérieures de la vessie et est un facteur de risque important de bactériémie [232-236]. *P. stuartii* n'est pas particulièrement envahissant, toutefois, certaines circonstances ont tendance à augmenter la probabilité d'une infection, y compris le cathétérisme prolongé et la chirurgie urinaire. Cette espèce est également résistante à de nombreux antibiotiques courants, y compris la plupart des pénicillines, les aminosides, les tétracyclines, les céphalosporines âgées, le sulfaméthoxazole et la fosfomycine [237-240]. Cette résistance aux antibiotiques donne *P. stuartii* un avantage opportuniste chez les patients nosocomiales. En outre, *P. stuartii* a également été impliquée dans la septicémie (bactériémie), avec des symptômes typiques que d'autres septicémies, sauf que l'effondrement vasculaire n'est pas une caractéristique importante [241, 242]. Bien que les cas de septicémie à *P. stuartii* prouvent généralement être fatale en raison de la résistance aux antibiotiques, la survie des patients en réponse au traitement médical a été rapporté dans les études de cas individuels [243] et, plus récemment, dans les enquêtes épidémiologiques à long terme [232, 235]. Dans ce dernier cas, Woods et Watanakunakorn [235] ont trouvé un taux de 25% de mortalité dans une étude de 49 cas de bactériémie à *P. stuartii*. Considérant que 51% des patients dans cette étude ont été infectés par plus d'une espèce bactérienne (bactériémies polymicrobien), le taux de mortalité par la bactériémie à *P. stuartii* seul est probablement plus faible. Les principales différences entre *P. stuartii* et *P. rettgeri* sont au niveau biochimique. *P. rettgeri* peuvent métaboliser les sucres D-arabitol, l'adonitol et l'érythritol. Par contre, la plupart des souches de *P. rettgeri* présentent des propriétés pathogènes similaires à ceux de *P. stuartii*. Les infections urinaires à *P. rettgeri* chez les patients cathétérisés et autres sont également difficiles à traiter en raison de la résistance multiple aux antibiotiques [244-246].

Contrairement à *P. stuartii* et *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens* est un pathogène entérique invasive et impliqués comme cause de maladies diarrhéiques [247-251]. Dans les études

utilisant des cultures pures provenant de spécimens de selles, il a été montré que le développement de la diarrhée est accompagnée d'une histopathologie intestinale typique que les autres espèces bactériennes invasives telles que *Shigella flexneri* [247]. Mathan *et al.* [252] ont ajouté plus de preuves pour la virulence des espèces de *P. alcalifaciens* envahissante en montrant deux modes d'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales. Le premier mode d'entrée est par endocytose directe associée à la polymérisation des composants du cytosquelette, et le second mode par lequel les bactéries pénètrent à travers la perturbation des jonctions serrées, et prolifèrent dans les espaces intercellulaires. Les capacités invasives de *P. alcalifaciens* ont été testés en cellules HEp-2 (une lignée de cellules épithélioïdes d'un carcinome du larynx humain) par deux groupes de scientifiques indépendants [229, 247]. Les deux groupes étaient en mesure de confirmer la pénétration par les isolats de *P. alcalifaciens*, alors qu'aucune souche de *P. stuartii* ou *P. rettgeri* testé n'envahi les cellules HEp-2.

4.4. Facteurs de virulence

Ce qui a été étudié et contribue à la pathogénicité de *Providencia sp.* comprend l'adhésion cellulaire, la production de fimbriae et l'uréase. *P. stuartii* a fait l'objet de la majeure partie de la recherche.

4.4.1. Adhérence et fimbriae

Les infections des voies urinaires dues à *P. stuartii* persistent plus longtemps que celles dues à d'autres bactéries Gram-négatives. Il a été suggéré que la raison possible de cette persistance accrue peut être due à la capacité de *P. stuartii* à adhérer aux cellules uroépithéliales [253]. L'adhérence aux cellules uroépithéliales peut être renforcée par l'expression de MR/K (hémagglutinine) like fimbriae. Mobley *et al.* [254] ont constaté qu'une proportion importante de *P. stuartii* isolé de patients présentant une bactériurie de longue durée a exprimé les fimbriae MR/K. Ces données ont montré le rôle important de l'hémagglutinine MR / K dans la persistance de UTI à *P. stuartii*.

4.4.2. Uréase.

Alors que *P. rettgeri* est uréase positif, tout comme certaines souches de *P. stuartii*. En fait, *P. rettgeri* et *P. stuartii* ont été initialement subdivisé en fonction de la production d'uréase [255]. Il existe certaines preuves que les souches de *P. stuartii* productrices d'uréase sont plus susceptibles d'être impliqués dans la colonisation à long terme des cathéters urinaires avec le développement ultérieur des blocages dus à la formation de calculs [256, 257]. les souches de *P. stuartii* productrices d'uréase ont également été trouvés pour inhiber la croissance *in vitro* de *E. coli* sur les surfaces du cathéter et dans l'urine [258]. Cet avantage adaptatif de la croissance peut expliquer pourquoi *P. stuartii* est l'espèce dominante isolée dans ces infections mixtes.

4.5. Sensibilité aux antibiotiques

P. rettgeri et *P. stuartii* sont généralement résistants à la gentamicine et la tobramycine mais sensibles à l'amikacine. Les isolats d'urinaires sont sensibles aux céphalosporines orales à spectre élargie, y compris le céfclor, le céfuroxime, le cefetamet, la cefpodoxime, la ciprofloxacine et l'amoxicilline /acide clavulanique [259]. *Providencia spp.* sont également sensibles à la thiénamycine, la céftazidime, la céfotaxime, la céftizoxime, et la moxalactam. Les autres choix pour la thérapie antimicrobienne comprendront la céftriaxone, la mezlocilline, l'imipénème et le triméthoprim/sulfaméthoxazole [260].

Dans une étude de surveillance continue de l'utilisation de l'imipénème et de la ciprofloxacine avec des isolats cliniques non exigeants, Fass *et al.* a indiqué que la sensibilité de *P. stuartii* à la ciprofloxacine passés de 100 à 46% sur une période de 6 ans dans leur établissement, illustrant le potentiel d'émergence de résistance dans ce groupe et la nécessité des tests de sensibilité de routine [261]. La quasi-totalité des souches de *Morganella spp.*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* et *Providencia* sont capables de produire les β -lactamases inductibles qui hydrolysent les pénicillines et les céphalosporines primaire et à spectre étendu [262]. Pour ces raisons, la sensibilité des souches de *Providencia* doit être surveillée et des tests spécialisés peuvent être nécessaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Cadre de l'étude et population étudiée

L'objectif de notre étude est d'évaluer la fréquence d'isolement, les méthodes d'identification et la caractérisation de l'antibio-résistance de souches de *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* (PMP) de la famille des *Enterobacteriaceae* responsable d'infections chez des patients hospitalisés dans différents services du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine (CHUC), ainsi que des sujets non hospitalisés venus en consultation externe, sur une période d'une année. Au cours de cette période, différents échantillons cliniques ont été colligés à partir de différents prélèvements (sang, urine, suppurations, etc.).

Dans ce travail nous avons commencé par l'isolement et l'identification des souches de PMP par différentes méthodes (phénotypiques puis moléculaires), la caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques et enfin, la détermination moléculaire des gènes de résistance et leur séquençage. Les séquences obtenues sont analysées, par le logiciel « codan code aligner », et comparées avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée « GenBank » à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Il est à noter que les examens bactériologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie du CHUC. L'étude moléculaire a été réalisée au niveau de l'Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), UMR CNRS-6236, IRD189, IFR48, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

2. Types de prélèvement et leur mode de traitement spécifique

2.1. Matériel biologique

Il est souhaitable d'effectuer les prélèvements avant d'instaurer un traitement antibiotique.

2.1.1. Urine

Ce prélèvement peut être réalisé chez des sujets :

2.1.1.1. Sans sondage : cette technique n'est possible que chez les sujets capables de maîtriser leur miction.

Chez l'homme et le garçon : le prélèvement se fait après un lavage soigneux du méat urinaire au dakin ou au savon doux. Après élimination du premier jet, on recueille les urines du matin au milieu du jet dans un flacon stérile, la fin du jet est jetée.

Chez la femme et la fillette : le prélèvement se fait après nettoyage soigneux au dakin du méat urétral et de l'orifice vaginal. Le recueil se fait au milieu de jet des urines de la première miction du matin si possible en dehors des périodes menstruelles ou d'infection vaginale.

Chez le nourrisson on utilise soit la technique de :

- **Recueil "à la volée" ou milieu de jet :** c'est la technique à privilégier: en réduisant la contamination des urines par la flore périnéale, elle assure une meilleure fiabilité des résultats. Cette technique est utilisable chez les nourrissons qui urinent en général toutes les 20 à 30 minutes. Après une toilette soigneuse de la vulve ou du prépuce et du gland de l'enfant, il faut allonger l'enfant, sans couche ou couche ouverte, sur ces genoux et se tenir prêt à recueillir les urines du milieu du jet au moment de la miction spontanée.

- **Recueil d'urines à l'aide d'un collecteur (poche):** après une toilette soigneuse de la vulve ou du prépuce et du gland de l'enfant au savon, suivie d'un rinçage à l'eau et d'un séchage, ou nettoyer à l'aide d'une lingette désinfectante. Il faut détacher et jeter la découpe centrale de la poche et retirer le revêtement qui protège l'adhésif. Appliquer en massant pour garantir une bonne adhérence. Si l'enfant n'a pas uriné au bout de 30 minutes, retirer

impérativement la poche (risque de contamination des urines), refaire une toilette locale et mettre en place une poche neuve. Dès que la miction est terminée, retirer la poche en soulevant un coin et en détachant doucement.

2.1.1.2. Ayant une sonde urinaire : urétrale, suspubien, d'urétérostomie ou de néphrostomie. Quelque soit le système de drainage utilisé pour ponctionner, on doit clamber le tuyau d'évacuation pendant 10 minutes afin de laisser l'urine s'accumuler en amont, puis on ponctionne la tubulure après désinfection à l'alcool iodé de la région où on va ponctionner. Il ne faut pas déconnecter le système de drainage qui doit rester fermé.

2.1.2. Pus et suppurations

Les suppurations peuvent être séparées en deux classes :

2.1.2.1. Profondes : il s'agit de prélèvements provenant de zones profondes fermées, normalement stériles comme le liquide des séreuses, le liquide pleural, le liquide articulaire, le liquide péricardique, le liquide synovial, etc. Ces prélèvements sont obtenus à l'aide d'une aiguille montée d'une seringue, ou bien par ponction à travers la peau ou les muqueuses après une désinfection soigneuse du point de la ponction.

2.1.2.2. Superficielles: il s'agit de collections suppurées provenant de zones superficielles possédant leur propre flore commensale (escarres, brûlures). On enlève au début les débris cellulaires et tissulaires par lavage avec de l'eau physiologique. Puis à l'aide d'un écouvillon on fait le prélèvement le plus profond possible.

2.1.3. Hémoculture

Le prélèvement du sang pour hémoculture est réalisé lors de la suspicion d'une bactériémie. Il consiste à recueillir du sang, aseptiquement, au cours d'une même ponction, dans 2 flacons, type flacon de Castaneda, l'un destiné aux bactéries aérobies et l'autre aux anaérobies.

La ponction veineuse est la seule méthode valable pour prélever le sang en vue d'une culture bactériologique. Les autres sites de prélèvements, notamment les recueils de sang à

travers un dispositif intravasculaire, augmentent de façon significative la fréquence des contaminations.

Il faut prélever une quantité de sang suffisante, 10 ml chez l'adulte et 2 à 5 ml chez l'enfant.

On réalise en général 3 prélèvements, à environ une heure d'intervalle, effectués si possible au moment d'un pic d'hyperthermie ou d'hypothermie ou lors de frissons qui signent une décharge bactériémique.

2.1.4. Ponction lombaire

Le prélèvement de Liquide Céphalo-Rachidien (LCR), est réalisé le plus souvent en urgence lorsqu'une méningite est suspectée.

Après désinfection cutanée du site de ponction et des mains du manipulateur, le LCR est prélevé par ponction des espaces arachnoïdiens dans la région lombaires à l'aide d'une aiguille à ponction lombaire. Le LCR est obtenu après ponction entre les vertèbres L₄-L₅ ou L₅-S₁. Le patient doit s'allonger sur un côté et courber le dos (en repliant les genoux vers la poitrine). Une anesthésie locale peut être réalisée.

2.1.5. Ponction pleural

La ponction pleurale est le prélèvement du liquide sécrété de manière anormale par la plèvre qui est l'enveloppe qui entoure les poumons. Le recueil du liquide s'effectue entre 2 côtes soit par aspiration par une sonde reliée à un vide mural, le liquide étant recueilli dans un bocal, soit par aspiration à la seringue.

2.1.6. Ponction d'ascite

Cet examen permet de prélever un peu de liquide qui se trouve anormalement dans la cavité abdominale, entourant les organes. Le prélèvement de ce liquide est effectué à la seringue, l'aiguille est introduire au niveau du 1/3 externe de la ligne reliant l'ombilic à l'épine iliaque antérosupérieure gauche, après une désinfection large de la paroi abdominale. Ce prélèvement est contre indiqué s'il y a baisse des facteurs de coagulation.

2.1.7. Prélèvement endotrachéal

Le prélèvement est réalisé chez un malade intubé ou trachéotomisé. Les échantillons d'aspirat endotrachéal, doivent être recueillis, de façon stérile, dans un tube endotrachéal en aspirant dans un collecteur stérile. Cette technique ne doit être utilisée que par un personnel médical bien formé.

2.1.8. Dispositifs de soins (sondes, cathéters et drains)

L'ablation du dispositif de soins doit se faire stérilement, et son extrémité distale (la totalité de la partie insérée pour les cathéters courts, 5 cm pour les cathéters longs) coupée et adressée au laboratoire dans un flacon stérile.

2.2. Transport :

Dans chacun de ces cas, les renseignements cliniques (annexe 1) sont indispensables pour orienter la recherche bactériologique et différencier les contaminants des germes infectieux. En cas de traitement antibiotique, la ou les molécules utilisées doivent être indiquées. Les prélèvements doivent être acheminés au laboratoire le plus rapidement possible.

2.3. Examen macroscopique

Il oriente la recherche bactériologique et il précise la couleur ou l'aspect du prélèvement, on doit noter :

- L'aspect du liquide : trouble, purulent, clair.
- La couleur : hématique, jaunâtre, blanchâtre.
- La consistance : fluide, semi- fluide, épais, visqueux.
- L'odeur : une odeur fétide peut orienter vers un germe anaérobie.

2.4. Examens microscopiques

2.4.1. Examen à l'état frais

2.4.1.1. Examen cytologique

L'étude quantitative est essentielle pour l'étude du LCR et des ponctions. Cet examen comporte la numération à l'aide d'un dispositif à numération, type cellule de Malassez ou bien

cellule de Nageotte, on dénombre les différents éléments figurés contenus dans un volume donné du prélèvement à étudier, qui doit être effectué le plus rapidement possible après le prélèvement.

2.4.1.2. Examen entre lame et lamelle

Un examen direct à l'état frais permet d'apprécier l'abondance de la flore microbienne et surtout d'observer la mobilité des bactéries. Il permet aussi de renseigner sur la présence ou l'absence des cellules telles que les globules blancs, les hématies, les cellules épithéliales...

2.4.2. Examens après coloration

2.4.2.1. Coloration au bleu de méthylène

Cette coloration permet de confirmer la cytologie déjà observée grâce à la cellule de Nageotte. Elle permet d'apprécier la réaction cellulaire, car il est important de savoir si la réaction est faite de lymphocytes ou de polynucléaires.

De plus, cette coloration permet de faire la mise en évidence éventuelle de l'état de ces cellules (intactes ou altérées), et de la bactérie, sa forme (cocci, bacille) et sa disposition par rapport aux cellules (intra ou extra cellulaire). La présence d'image de phagocytose du germe est évocatrice de sa responsabilité dans le déclenchement de l'infection. De plus, elle permet d'apprécier l'agencement des bactéries (isolées, diplocoques, flammes de bougies, diplobacilles...)

2.4.2.2. Coloration de Gram

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.

NB : les *PMP* sont des BGN polymorphe, très mobiles, mais qui ressemblent aux autres entérobactéries du point de vue morphologique.

3. Mise en culture et isolement

Vue la diversité des échantillons, la mise en culture nécessite l'utilisation de milieux spécifiques et l'incubation dans différentes atmosphères (aérobie, anaérobie CO₂) : gélose au sang cuit (chocolat enrichi) sous CO₂, gélose au sang frais, gélose Chapman, Hektoen et gélose nutritive.

Dans le but d'isoler les *Proteus*, *Morganella* et *Providencia*, toutes les colonies qui poussent après 18 à 24H d'incubation à 37°C sur les géloses d'Hektoen, gélose nutritive, gélose au sang cuit ou gélose au sang frais, et qui présentent l'aspect des colonies spécifique de *PMP* (Colonies grosses, non hémolytiques, envahissant parfois la surface de milieux riches en ondes concentriques pour les *Proteus* et présentent une odeur désagréable caractéristique) ont fait l'objet d'une suite d'étapes d'identification.

4. Identification des souches isolées

Les bacilles du group *PMP* colligés sont identifiés grâce à 3 méthodes différentes

4.1. Tests biochimiques

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous espèces de bactéries. Il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées.

4.1.1. Méthode classique (Annexe 3)

Après ensemencement sur milieux gélosés et coloration de Gram, toutes les souches qui ont poussé sur Hektoen et gélose nutritive sont identifiées selon les méthodes classiques utilisées au laboratoire de microbiologie de CHUC en utilisant les galeries biochimiques classiques spécifiques pour entérobactéries. Ces galeries comportent les tests suivants :

➤ **Gélose T.S.I** (Triple Sugar Iron agar): cette gélose permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (H₂S).

➤ **Milieu mannitol-mobilité-nitrate** : il est utilisé pour la différenciation rapide des entérobactéries, en recherchant la mobilité, l'utilisation du mannitol et la réduction des nitrates.

➤ **Milieu au citrate de sodium (milieu de Simmons)** : c'est une gélose inclinée qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles et ainsi de les identifier.

➤ **Milieu urée-indole** : ce milieu permet de mettre en évidence chez les entérobactéries la présence d'une uréase, d'une tryptophane-désaminase (TDA) ainsi que la production d'indole. Il permet ainsi la différenciation présomptive des bactéries possédant ces caractères. La dégradation de l'urée par les bactéries possédant une uréase s'accompagne d'une alcalinisation qui provoque le virage au rouge violet de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

Le milieu contient du L-tryptophane :

- sa dégradation par les bactéries possédant une tryptophanase s'accompagne d'une production d'indole, révélée au moyen du réactif de Kovacs : en cas de réaction indole positive, un anneau rouge apparaît en surface du bouillon.

- sa dégradation par les bactéries possédant une tryptophane-désaminase s'accompagne d'une production d'acide indole-pyruvique révélée au moyen d'une solution de perchlorure de fer par l'apparition d'un précipité brun noir.

➤ **Milieu de Clark et Lubs** : ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation du glucose. Chez les BGN, la fermentation du glucose conduit à la production :

- Soit de nombreux acides par la voie des fermentations des acides mixtes qui sont mis en évidence par le test RM (au rouge de méthyle), qui consiste à apprécier le pH du milieu après 24 heures de culture :

- soit le pH est supérieur à 7 : le test est dit négatif : il y a eu une faible alcalinisation ou une réalcalinisation.

- soit le pH est inférieur à 4,5 : le test est dit positif : il y a eu une forte acidification qui s'est maintenue.

Cela laisse supposer que :

- les bactéries RM + sont des bactéries produisant des acides organiques par la voie des acides mixtes

- les bactéries RM - sont des bactéries qui n'utilisent pas la voie des acides mixtes, mais celle du butane-diolique (voir VP).

- Soit de l'acétoïne produit par fermentation butanediolique qui est mise en évidence par le test VP (Voges-Proskauer), qui consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée en rose après 15min, le butanediol et l'acétoïne.

4.1.2. Système API 20 E (Annexe 4)

A l'issue de l'identification classique réalisée sur toutes les souches isolées, 108 souches ont été sélectionnées au hasard pour revérifier l'identification par les galeries biochimiques API 20E (Analytical Profile Index) BioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Cette galerie prête à l'emploi est un système standardisé permettant d'identifier des bacilles à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. La technique consiste à réaliser 23 tests biochimiques, puis interpréter les résultats à l'aide de la base de données présentée sur le catalogue analytique API 20^E fournis par Bio-Mérieux.

La galerie est constituée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, lesquels sont mis en solution par l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier. Une période d'incubation de 18 à 24 heures à 37°C permet à la bactérie de réagir avec les substrats. Les réactions produites après la période d'incubation se traduisent par des virages colorés. La compilation des résultats de l'utilisation des substrats par la bactérie à identifier permet de déterminer un code de 7 chiffres qui correspond à une bactérie bien déterminée.



Figure 9. Galerie API 20E identifiant *P.mirabilis*

Il est à noter que les 108 souches de *PMP*, qui vont subir l'identification moléculaire, ont été conservées sur gélose de conservation, « Stock Culture Agar de 3 mL » de BioMérieux (Marcy l'Etoile, France), spécifique pour l'entretien des *Enterobacteriaceae*. Les bactéries restent viables pendant environ 5 ans à 18 à 20° C.

4.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) est une technique qui permet l'identification des microorganismes par analyse de leur contenu protéique. La première utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification des bactéries date de 1975 [263]. Cette méthode analyse le déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques. Un mélange matrice-échantillon cocrystallisé sur une surface métallique ou cible est soumis au tir d'un faisceau laser permettant sa désorption et son ionisation. Le temps de vol de ces ions obtenus à partir de bactéries entières est mesuré et permet l'obtention d'un spectre de masse. Parmi les nombreux pics produits, les principaux correspondent à des protéines ribosomales et semblent spécifiques d'espèce [264].

Le protocole appliqué pour identifier les souches bactériennes isolées, réalisé aux laboratoires de l'URMITE de la Faculté de Médecine de l'Université de la Méditerranée (Marseille, France), est le suivant:

4.2.1. Nettoyage de la cible

Il consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude puis la frotter avec du papier en versant dessus de l'éthanol à 70%. La cible est ensuite plongée dans l'éthanol pendant 15 mn, frottée avec 500µl du TFA (Acide TriFluorocétique) à 80% puis rincée avec de l'eau HPLC. Cette dernière est, enfin, laissée sécher à l'air libre.

4.2.2. Préparation de la matrice

Une matrice solide est utilisée comme véhicule pour la substance à analyser à l'aide de laser pour l'analyse MALDI. Cette matrice permet de protéger l'échantillon d'une ionisation directe, de refroidir les ions grâce à une distribution plus fine de l'énergie cinétique, d'améliorer le rendement d'ionisation et aussi de ne pas ajuster la longueur d'onde de travail du laser à la longueur d'onde d'absorption de chaque échantillon.

Une solution de matrice saturée a été préparée, sous une hotte chimique, dans un tube Eppendorf par addition de 2 spatules de la matrice (typiquement d'alpha- cyano- 4 hydrocinnamic acide, HCCA) à 500 µl d'acetonitril HPLC, 250 µl de TFA à 10% et 250 µl d'eau HPLC, une petite quantité de matière insoluble est observée.

La solution est agitée, soniquée au bain à ultrasons (pendant 10 minutes), centrifugée à 13000 rpm pendant 5 minutes et le surnageant est transféré dans un tube à Eppendorf propre. La matrice est, ainsi, prête à l'emploi.

4.2.3. Préparation des échantillons et analyse spectrométrique

Pour chaque souche, une seule colonie bactérienne, d'une culture pure de 24h, a été déposée, sous un PSM (poste de sécurité microbiologique), sous forme d'un fin frottis d'environ 5mm² sur les spots à la surface de la plaque métallique servant de cible aux tirs du

laser. Afin de réduire le risque d'erreur, 4 spots ont été réalisés pour chaque souche. Des témoins positif et négatif ont été utilisés. Après séchage sous hotte, 2µl de matrice cyanohydroxycinnamique ont été ajoutés sur chaque spot. Une seconde étape de séchage sous hotte permettait sa cocristallisation avec l'échantillon bactérien. La cible est ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex LT3, Sy004510, Bruker Daltonics, Wissembourg, Allemagne) et exposée, sous-vide, aux tirs du laser après remplissage de la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control et lancement de spectromètre de masse : Microflex.

4.2.4. Traitement des données avec le logiciel Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics)

Le temps de vol des espèces ioniques et les spectres de masse ainsi obtenus sont analysés grâce au logiciel Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics) dans le contexte d'une identification microbienne. Cette identification étant basée sur la comparaison de la position, la fréquence et l'intensité des pics du spectre de masse inconnu avec tous les spectres typiques enregistrés dans la banque de données d'empreintes spectrales de souches de référence. Un score de correspondance basé sur les masses identifiées et leur corrélation d'intensité est généré et utilisé pour le classement des résultats. Un score entre 2,33 et 3 est considéré comme une très probable identification d'espèce, entre 2 et 2,32 comme une bonne identification de genre et une probable identification d'espèce, entre 1,7 et 1,999 comme une probable identification de genre, requérant d'autres tests. Les scores inférieurs à 1,999 ne permettent pas l'identification et l'échantillon doit donc être repassé ou soumis à d'autres tests.

4.2.5. Création de MSP dendrogramme

Le dendrogramme, basé sur les spectres obtenus, est créé par la méthode standard de MALDI Biotyper MSP (Bruker, Brême, Allemagne) en utilisant le logiciel « Biotyper 3 ».

L'identification par MALDI-TOF MS est comparée à celle basée sur l'analyse de la séquence du gène ADN_r 16S.

4.3. Identification moléculaire par séquençage de gène ADNr 16S

L'outil universel d'identification moléculaire bactérienne est le gène ADNr 16S [265, 266]. Il mesure environ 1500 paires de base, il évolue lentement et possède des séquences hautement conservées en 5' et en 3' ce qui permet l'emploi d'amorces universelles. Plusieurs milliers de séquences de ce gène sont actuellement déposées dans les banques de données.

4.3.1. Préparation de l'ADN

La préparation de l'ADN génomique a été réalisée en inoculant directement la colonie dans le milieu réactionnel de la PCR (*Colony PCR*) comme décrit par Hofmann et Brian [267]. Durant les premières étapes de dénaturation, les cellules sont lysées et leur ADN est libéré dans le milieu réactionnel. L'ADN ainsi libéré sert donc de matrice.

4.3.2. Polymérase Chain Réaction (PCR) standard

Mise au point par Kary Mullis et *al.* en 1986 [268], la PCR consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible. Les réactions d'amplification de gène codant pour l'ADNr 16S sont réalisées avec des couples d'amorces universelles spécifiques (FD1 et rP2) comme décrit par Weisburg et *al.* [269] (Tableau 8), dans un thermocycleur de type Applied Biosystems® en présence de *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN) en respectant les conditions d'utilisations spécifiées par le fournisseur. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés. Les séquences sont comparées à celles déposées dans une banque de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Tableau 8. Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard de l'ADNr 16S

Gène	Amorce	Sequence 5'-3'	Taille du produit de PCR	Références
16S rDNA	FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(~1500 pb)	[269]
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT		

4.3.2.1. Réalisation et programme d'amplification

L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur de type Applied Biosystems®. Une plaque de PCR à 96 puits, BioRad, est utilisée avec un volume réactionnel de 50 µL (dont 45 µL de mélange de réaction et 5 µL d'ADN à amplifier) dans chaque puit. Le mélange de réaction PCR «mix» pour chaque échantillon est détaillé dans le Tableau 9. Pour chaque échantillon, 3 réactions sont préparées.

Tableau 9. Mélange réactionnel de préparation du Mix pour PCR standards

Mix PCR pour une réaction	Volume (en µl)
dNTP	5
PCR Buffer 10x	5
FD1	1
rP2	1
Taq DNA polymérase	0.25
H ₂ O UP	32.75
DNA	5
Volume total	50

L'opération débute par une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min, ensuite 35 cycles comportant 30 secondes de dénaturation à 94°C, 45 secondes d'hybridation à 55°C, 2 min d'élongation à 72 °C et enfin terminée par une élongation finale à 72°C pendant 7 min permettant de terminer la synthèse des brins inachevés.

4.3.3. Mise en évidence des amplifiats

Afin d'évaluer la réussite de l'amplification, le produit de PCR est soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% immergé dans du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 5%. La migration est faite pendant 20 minutes sous un voltage de 135V.

4.3.3.1. Préparation du gel d'agarose

Un gramme de poudre d'agarose est dissout dans 100ml de tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 5 X. Le mélange est mis à fondre dans un four à micro-onde jusqu'à obtention d'un gel transparent qu'on doit laisser refroidir.

Une solution de bromure d'éthidium (BET) est ajoutée (3 fois 30 µl pour 50ml de gel) et mélangée. Le BET est utilisé comme révélateur des acides nucléiques, il émet une fluorescence lorsqu'il est exposé à une lumière ultraviolette. Enfin, le gel est coulé dans le support du gel après avoir mis les peignes et laissé refroidir jusqu'à solidification.

4.3.3.2. Electrophorèse des produits d'amplification

Après polymérisation du gel, ce dernier est placé dans la cuve d'électrophorèse remplie avec le tampon TBE 5X (le gel doit être totalement immergé).

Un prélèvement de 5 µL de chaque échantillon amplifié, avec le témoin négatif et le témoin positif, est mélangé avec 2 µL de tampon de charge (10 X Blue Juice), dont le rôle est d'augmenter la densité du mélange, donc de faciliter le dépôt de l'échantillon dans les puits, et de pouvoir suivre la migration.

Un marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (G752A, 31249501, Bench Top pGEM DNA Markers)] est choisi et 4 µL sont déposés dans le premier puit de chaque gel. La migration est effectuée sous 135 V pendant une durée de 20 minutes environ.

Une photographie du gel déposé sur un transilluminateur UV est prise à l'issue des 20 minutes de migration pour la visualisation des bandes. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié est comparée avec le marqueur de poids moléculaire en utilisant le témoin positif. La taille attendue est d'environ 1500 pb.

4.3.4. Purification de l'ADN

Après électrophorèse, la présence des bandes ADN est vérifiée sur le système d'imagerie à UV. Afin de purifier le produit de PCR de la réaction résiduelle, comme les dTNPs non

constituées, les amorces et enzymes résiduelles qui peuvent interférer avec les méthodes suivantes de séquençage d'ADN, on ajoute au produit PCR 100µl d'eau ultra pure, puis on transfère le tout dans une plaque à filtre pour faire la première purification, on dépose cette plaque à filtre sur une pompe sous vide pendant 20 min à 25 bar de pression (filtration sous vide). Ensuite on ajoute 50 µl d'eau ultra pure et on agite pendant 20 min sur un agitateur de plaques. Le produit est purifié et prêt pour la PCR Big Dye.

4.3.5. Séquençage

Le séquençage est réalisé selon la méthode de Sanger modifiée [270], en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur automate ABI 3730 (Applied Biosystems), en suivant les recommandations du fournisseur.

4.3.5.1. PCR Big Dye

Les produits amplifiés d'environ 1500 pb sont séquencés en utilisant une modification de 8 amorces comme décrit sur le tableau 10. Le séquençage est effectué en utilisant le kit de séquençage «Big Dye Terminator Cycle Sequencing » (Applied Biosystems). Cette étape consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. Le milieu réactionnel est composé de 4 µl d'ADN à séquencer, de 2µl de « Terminator ready reaction mix » [(Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués par un composé fluorescent (« dye »)], de 3µl de tampon de dilution (*BigDye Terminator Sequencing Buffer*)] et de 1µl d'amorces dans un volume final de 20µl (Tableau 11) dans chaque puits. Pour chaque amorce, indiquée dans le tableau 10, 2 mélanges réactionnels sont réalisés séparément : un pour le Forward et l'autre pour le Reverse. L'élongation des amorces s'effectue dans un thermocycleur Bio-rad en 25 cycles selon le programme décrit dans le tableau 12.

Tableau 10. Séquences des amorces utilisées pour la PCR *BigDye*® de l'ADNr 16S

Gène	Amorce	Sequence (5'-3')	Références
16S rDNA	FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[269]
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
	536-F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	[271]
	536-R	GTATTACCGCGGCTGCTG	
	800-F	ATTAGATACCCTGGTAG	
	800-R	CTACCAGGGTATCTAAT	
	1050-F	TGTCGTCAGCTCGTG	
	1050-R	CACGAGCTGACGACA	

Tableau 11. Mélange réactionnel pour la PCR *BigDye*®

Composants pour Forward	Composants pour Reverse	Volume (en µl)
Buffer	Buffer	3
Mix Big Dye	Mix Big Dye	2
Amorce F	Amorce R	1
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4
H ₂ O UP	H ₂ O UP	10
Volume total		20

Tableau 12. Programme de l'amplification de la PCR *BigDye*®

Températures	96°C	96°C	50°C	60°C
Temps	2min	10sec	5sec	4min

4.3.5.2. Purification par Sephadex

La purification de l'ADN obtenu est faite sur colonnes de résine Sephadex® G50 de la marque sigma, en chargeant la résine sèche Sephadex® G-50 superfine dans les puits d'une plaque MultiScreen HV, format HTS en utilisant le chargeur de colonne de 45 µl comme suit:

- Déposer la résine Sephadex® G 50 dans chaque puit (45µl) du chargeur de colonne.
- Retirer l'excès de résine avec la raclette.
- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble.
- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.
- Ajouter 300 µl d'eau ultra pure dans chaque puit contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à température ambiante.
- Une fois les mini-colonnes gonflées dans la plaque MultiScreen, placer cette dernière sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits et centrifuger l'ensemble à 1200 rpm pendant 5min à 10°C pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.
- Déposer délicatement les produits PCR Big Dye à purifier au centre des mini-colonnes, et placer la plaque MultiScreen HV sur une deuxième plaque de polypropylène au format standard 96 et centrifuger (à 1200 rpm pendant 5min à 10°C) pour collecter les produits PCR purifiés dans l'eau. Cette plaque est ensuite recouverte par un tapis de protection. Ainsi le produit récupéré est prêt à être séquencé.

4.3.5.3. Séquençage

Sur la machine du séquenceur automate du modèle ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). On commence par remplir les fiches pour séquençage sur le logiciel, après, on met la plaque pour le séquençage sur le support et on la dépose dans le séquenceur automate ABI 3730 pour en fin le mettre en marche. La longueur des séquences

obtenues pour chaque amorce est différente, mais ces amorces sont suffisantes pour fournir la couverture de séquence (figure 10.).

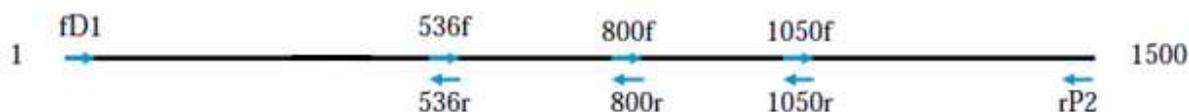


Figure 10. Amorces universelles pour le séquençage de l'ADNr 16S

4.3.6. Analyse des séquences

Les résultats du séquençage des fragments d'ADNr amplifiés sont obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts. Ces derniers sont visualisés par le logiciel SequenceScanner (Applied Biosystems). Les alignements du couple des séquences sens/antisens sont effectués par le logiciel codon code Aligner pour définir la séquence consensus qui sera analysée et corrigée par la suite par le même logiciel. Les séquences obtenues sont comparées à des séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale de données dénommée « GenBank » à l'aide de Blast (Basic Local Alignment Search Tool) dans le site web de Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin de déterminer leur affiliation phylogénétique. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches [272].

4.3.7. Analyses phylogénétiques des séquences et construction des arbres phylogénétiques

Pour les analyses phylogénétiques et la construction d'arbres phylogénétiques qui montrent la position taxonomique de chaque isolat, les séquences sont coupées afin de commencer et finir à la même position nucléotidique pour toutes les souches étudiées. L'alignement multiséquence est effectué en utilisant le programme Clustal X , Version 2.1 [273]. Les arbres phylogénétiques sont obtenues à partir de séquences d'ADN, en utilisant la

méthode de neighbor-joining avec le modèle de correction de la distance de Kimura « Kimura's two-parameter » (K2P) par le logiciel Méga 4 [274].

4.4. Identification moléculaire par séquençage de gène *rpoB*

Cette étape est réalisée pour seulement 30 souches en fonction de la disponibilité des amorces. L'amplification de gène codant pour le *rpoB* est réalisée en utilisant les amorces CM7F et CM31bR [275] décrites dans le Tableau 13. Le mix de réaction PCR pour chaque échantillon est préparé en utilisant le Master Mix « *QuantiTect* » de (QIAGEN) comme détaillé dans le Tableau 14. La PCR s'effectue dans un thermocycleur Bio-rad selon le programme suivant : une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, ensuite 36 cycles comportant 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 53°C, 3 min d'élongation à 72 °C et enfin terminée par une élongation finale à 72°C pendant 10 min permettant de terminer la synthèse des brins inachevés. Le reste des étapes d'identification par séquençage de gène *rpoB* est réalisée par les mêmes étapes que celles du 16S rDNA.

Tableau 13. Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard et le *BigDye*® de l'*rpoB*

Gène	Amorce	Sequence 5'-3'	Taille du produit de PCR	Références
<i>rpoB</i>	CM7-F	AACCAGTTCCGCGTTGGCCTGG	(~1100 pb)	[275]
	CM31b-R	CCTGAACAACACGTCGGA		

Tableau 14. Mélange réactionnel de préparation de Mix pour PCR standards

Mix PCR pour une réaction	Volume (en µl)
Quantitect Probe PCR Master Mix	12.5
FD1	0.5
rP2	0.5
H ₂ O UP	6.5
DNA	5
Volume total	25

5. Détermination des profils de résistance

5.1. Tests phénotypiques

5.1.1. Antibiogramme

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été étudiée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH) et les critères de lecture et d'interprétation ont été ceux du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour l'Antibiogramme réalisé au laboratoire de microbiologie du CHUC, et du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (www.sfm.asso.fr) pour celui réalisé à l'URMITE.

Les géloses sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension de germes à 0.5 MacFarland de turbidité de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/ml, conformément aux recommandations de la CA-SFM. Des disques d'antibiotiques sont déposés à la surface des géloses, à l'aide d'un distributeur.

Au cours de notre travail, l'antibiogramme est utilisé pour déterminer *In vitro* le profil de résistance de toutes les souches de *PMP* isolées à 14 antibiotiques communément utilisés en médecine humaine pour le traitement des maladies d'origine infectieuse. Les 14 antibiotiques choisis sont : l'amoxicilline (25 µg), l'amoxicilline/ acide clavulanique (20/10 µg), la ticarcilline (75 µg), la céfazoline (30 µg), la céfoxitine (30 µg), le céfotaxime (30 µg), l'imipénème (10 µg), la gentamicine (15 µg (10 UI), l'amikacine (30 µg), la colistine (50 µg), l'acide nalidixique (30 µg), la ciprofloxacine (5 µg), le triméthoprime/sulfaméthoxazol (1,25/23,75 µg) et le chloramphénicol (30 µg). Ces 14 antibiotiques sont également choisis, en fonction de leur disponibilité au sein du laboratoire de Microbiologie de CHUC.

L'antibiogramme est refait au niveau de l'URMITE, pour les 108 souches qui allaient subir l'étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques, en utilisant les 16 antibiotiques suivants : l'amoxicilline (25 µg), l'amoxicilline/ acide clavulanique (20/10 µg), le céfotaxime (30 µg), la céftazidime (30 µg), la céftriaxone (30 µg), l'aztréonam (30 µg), l'imipénème (10µg), la gentamicine (15 µg (10 UI), la kanamicine (30 UI), la tobramicine (10 µg), l'amikacine (30 µg), la péfloxacine (5 µg), la ciprofloxacine (5 µg), l'ofloxacine (5 µg), le triméthoprime/sulfaméthoxazol (1,25/23,75 µg) et la colistine (50 µg).

Les boîtes sont mises à incubation pendant 18 à 24 h à 37 °C. L'antibiogramme est contrôlé en utilisant la souche test *E. coli* ATCC 25922.

À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés. L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (communiqué du CA-SFM, 2010).

La recherche de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) est effectuée par un test de synergie entre un disque central d'amoxicilline / acide clavulanique distant de 30mm des disques de céfotaxime, céftriaxone, céftazidime et aztréoname. La présence de BLSE est suspectée par l'apparition d'un aspect de "bouchon de champagne" [276]. La production de BLSE a été vérifiée par l'ensemencement des souches sur milieu ESBL.

5.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par *E-Test*

Pour certaines souches de *PMP*, des tests complémentaires de sensibilité aux antibiotiques (*E-Tests*) ont été effectués. Les *E-Tests* étant des bandelettes en plastique non poreuses, le long desquelles 15 valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour un antibiotique donné y sont calibrées. Un gradient prédéfini d'antibiotique, de concentrations allant de 0,016 à 256 $\mu\text{g/ml}$ ou 0,002 à 32 $\mu\text{g/ml}$ selon l'antibiotique, est donc fixé sur la face de la bandelette opposée à l'échelle imprimée des CMI. Cette face sera celle mise en contact direct avec la gélose Mueller Hinton, ensemencé avec la souche à tester.

L'inoculum est préparé dans les mêmes conditions que l'antibiogramme, en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 MacFarland. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Mueller Hinton. Lorsqu'une bandelette *E-test* est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et diffuse sur la surface de la gélose en recréant le gradient prédéfini dans le milieu de culture. Un gradient continu et exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support. Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance

bactérienne visible, la bactérieensemencée poussera en formant une zone d'inhibition de croissance elliptique, symétrique et axée sur le support. La valeur lisible à la zone d'intersection entre la bandelette et l'ellipse de croissance bactérienne correspondra à la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique donné, exprimée en µg/ml. L'interprétation des valeurs des CMI lues sur la bandelette est effectuée, comme pour les antibiogrammes, en référence aux tables de référence édictées par le CA-SFM (communiqué du CA-SFM, 2010).

5.1.3. Recherche phénotypique des carbapénémases

Les carbapénèmes, derniers antibiotiques de la classe des β-lactamines, ont un très large spectre antibactérien et possèdent une grande stabilité vis-à-vis de la quasi-totalité des β-lactamases.

La recherche des carbapénémases par les tests phénotypiques est réalisée sur les souches présentant un diamètre diminué à l'imipénème. Nous nous sommes intéressés particulièrement à cet antibiotique, car la prescription des carbapénèmes devient de plus en plus fréquente, dans le cas des infections documentées à germe producteur de BLSE, mais également en traitement probabiliste en cas d'infection nosocomiale sévère. L'émergence de ces enzymes a été décrite de façon croissante dans le monde entier et constitue un réel problème de santé publique. Les carbapénèmes représentant très souvent les dernières molécules actives de l'arsenal thérapeutique pour combattre les bactéries multirésistantes.

5.1.3.1. Test de Hodge modifié

La version modifiée du test de Hodge, test phénotypique initialement mis au point pour permettre la détection de pénicillinases, est largement utilisée pour la détection des carbapénémases. Ce test consistait à ensemencer en culture confluyente (à l'aide d'un écouvillon) une dilution au 1/10^{ème} d'une suspension de Densité Optique (DO) = 0.5 Mc Farland de la souche *E. coli* ATCC 25922 (sensible aux antibiotiques actifs sur les BGN) sur une gélose Mac Conkey. Ensuite, un disque d'imipénème chargé à 10 µg a été déposé au centre de la boîte. A partir du disque un ensemencement est réalisé de manière radiale jusqu'au bord de la boîte de Pétri incluant la souche à tester, le témoin positif (*Klebsiella*

pneumoniae « Kpnasey » carbapénémase +) et un témoin négatif (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase -) (Figure 11).

Après incubation pendant 18 à 24 h à 37°C, la présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif et indique la présence d'une carbapénémase [277].

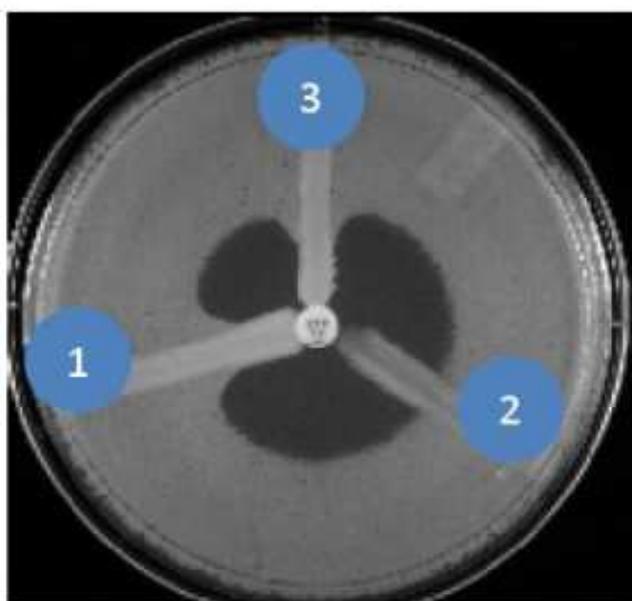


Figure 11. Test de Hodge modifié.

(1) *Klebsiella pneumoniae* « Kpnasey » : témoin positif ; (2) *Klebsiella pneumoniae* : témoin négatif ; (3) Souche à tester

5.1.3.2. Test de synergie EDTA-IMP (détection des métallo- β -lactamases)

Ce test consiste à ensemencer, à l'aide d'un écouvillon, une suspension (de 0.5 Mc Farland de densité optique) des souches à tester sur une gélose Mueller Hinton comme pour la réalisation d'un antibiogramme selon les recommandations du CA-SFM. Afin de détecter les métallo- β -lactamases, deux méthodes sont utilisées [278] :

- 1^{ère} méthode : un disque d'imipénème (10 μ g) est déposé à deux centimètres d'un disque vierge sur lequel 10 μ l d'EDTA (solution 0.5M, pH8) ont été déposés. Après incubation

à 37°C pendant 18 à 24 heures, si on observe une synergie entre les deux disques, les souches testées sont considérées comme productrices de métallo- β -lactamases.

- 2^{ème} méthode : dans la même boîte de gélose Mueller Hintonensemencée, deux disques d'imipénème sont déposés à 4cm environ l'un de l'autre. Sur l'un d'entre eux, 4 μ l d'EDTA (solution 0.5M, pH8) sont rajoutés. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés. Les souches dont le diamètre d'inhibition, autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul d'au moins 6mm, sont considérées comme productrices de métallo- β -lactamases.

5.1.4. Transfert de la résistance par conjugaison

Ce test a été réalisé sur les souches présentant une résistance très élevée à l'imipénème, il permet de déterminer s'il s'agit d'une résistance chromosomique ou bien codée par un plasmide.

Les bactéries donatrices (sensible à l'azide de sodium et possédant le plasmide d'intérêt) et les bactéries réceptrices (*E. coli* J53 résistante à l'azide de sodium) issues d'une culture jeune ont été cultivées séparément pendant 18 à 24 heures à 37°C, sous agitation en bouillon TSB « Trypticase Soy Broth ». Ces bactéries sont mélangées par la suite avec un rapport de 1/10 en prenant 1ml de bouillon de la bactérie donatrice et l'ajoutant aux 9 ml de bouillon de la bactérie réceptrice. Afin d'optimiser le contact, le mélange est agité doucement 2 à 3 fois et incubé pendant 18 à 24 heures à 37°C sans agitation.

Après conjugaison, les bactéries du mélange sont étalées sur la moitié des milieux sélectifs permettant de sélectionner les bactéries transconjugantes (bactéries receveuses ayant reçu le plasmide à l'issue de la conjugaison bactérienne) en incorporant aux géloses Luria Bertani (LB) :

- 1 ml de l'imipénème et 1 ml de de l'Azide de sodium à des concentrations finales de 8 μ g/ml et 100 μ g/ml respectivement.

- 1 ml de de la ceftazidime et 1 ml de de l'Azide de sodium à des concentrations finales de 8 μ g/ml et 100 μ g/ml respectivement.

Afin de vérifier la sélectivité des milieux utilisés on ensemence par spot (ou par dépôt de 4µl à l'aide d'une micropipette) la souche donatrice et la souche réceptrice dans l'autre moitié.

Après croissance à 37°C pendant 24h, les colonies bactériennes sélectionnées transconjugantes ont été identifiées par MLADI-TOF MS et soumises à l'antibiogramme afin de les comparer avec celui obtenu avec la bactérie donatrice et la souche *E.coli* J 53 pour vérifier le transfert de la résistance entre les bactéries donatrice et réceptrice.

Le transfert des gènes de résistance est vérifié en réalisant une PCR standard et séquençage des gènes codants pour les BLSE, carbapénèmases et AME.

5.2. Recherche moléculaire des gènes de résistance

Les antibiotiques sont des molécules qui bloquent des processus essentiels à la survie des bactéries. Ils ciblent principalement la synthèse de l'ADN (quinolones), la synthèse des protéines (aminosides, macrolides) ou la synthèse de la paroi bactérienne [279]. Les gènes de résistance codent le plus souvent pour des enzymes capables soit de dégrader l'antibiotique, soit de le modifier chimiquement pour le rendre inactif. Par exemple, dans le cas de β-lactamines, les gènes de résistance codent une bêta-lactamase, qui hydrolyse le cycle bêta-lactame de ces composés.

5.2.1. Recherche moléculaire des β-lactamases

Les β-lactamines constituent le premier groupe d'antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine, du fait de leur large spectre d'activité et de leur bonne tolérance. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'identification des β-lactamases de classe A, classe B, classe C d'Ambler.

5.2.1.1. Recherche moléculaire des BLSE

L'identification des BLSE de classe A est réalisée en amplifiant les gènes *bla_{CTX}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{PER}*, *bla_{VEB}* et *bla_{GES}* en utilisant des amorces spécifiques présentées dans le Tableau 15 dans un volume réactionnel de 25 µl (tableau 14) et suivant les conditions

requis : 15 min à 95°C puis 35 cycles (94°C – 1min, 55°C – 50sec, 72°C – 1min) et une élongation finale de 7min à 72°C. Le reste des étapes de séquençages sont effectuées selon les mêmes étapes que celles de l'ADNr 16S.

Tableau 15. Amorces utilisées pour les PCR standard des BLSE

Gène	amorce	Séquence des amorces	Taille du produit de PCR	Références
<i>bla_{CTX}</i>	CTX-M-F'	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	519 pb	[280]
	CTX-M-R'	CTCCGCTGCCGGTTTTATC		
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	860 pb	[281]
	TEM-R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	ATTTGTGCTTCTTTACTCGC	1051 pb	
	SHV-R	TTTATGGCGTTACCTTTGACC		
<i>bla_{PER}</i>	PER-F	GTAGTATCAGCCCAATCCCC	738 pb	[282]
	PER-R	CCAATAAAGGCCGTCCATCA		
<i>bla_{VEB}</i>	VEB-F	GGAACAACCTTTGACGATTGA	374 pb	[283]
	VEB-R	CCCTGTTTTATGAGCAACAA		
<i>bla_{GES}</i>	GES-F	GAAAAAGCAGCTCAGATCG	579 pb	
	GES-R	CAACAACCCAATCTTTAGGA		

5.2.1.2. Recherche moléculaire des carbapénèmases

Les carbapénèmases sont des β -lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. Ces enzymes appartiennent à trois classes selon la classification d'Ambler : la classe A (*KPC*, *IMP* et *GES*), la classe B correspond aux métallob- β -lactamases (*VIM*, *IMP* et *NDM*) et la classe D correspond essentiellement aux enzymes de type oxacillinase (*OXA-48*, *OXA-163* et *OXA-181*).

5.2.1.2.1. Polymerase Chain Réaction (PCR) standard

L'identification des carbapénémases à été réalisée en amplifiant les gènes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}* et *bla_{NDM}* en utilisant des amorces spécifiques présentées dans le tableau 16 dans un volume réactionnel de 25 µl comme détaillé dans le tableau 14 selon le programme de réaction de PCR classique comprenant une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec 1min à 94°C (dénaturations), 50 sec à 50-60°C (appariement des amorces, température variable selon le Tm des amorces) et 1 min 30 sec à 72°C (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 7 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés. Le reste des étapes de séquençages sont effectuées selon les mêmes étapes que celles de l'ADNr 16S.

Tableau 16. Amorces utilisées pour les PCR standard des carbapénémases

Gène	amorce	Séquence des amorces	Taille du produit de PCR	Référence
<i>bla_{OXA-23like}</i>	<i>bla_{OXA-23like}-F</i>	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501 pb	[284]
	<i>bla_{OXA-23like}-R</i>	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
<i>bla_{OXA-24like}</i>	<i>bla_{OXA-24like}-1</i>	GGTTAGTTGGCCCCCTAAA	246 pb	
	<i>bla_{OXA-24like}-2</i>	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
<i>bla_{OXA-58like}</i>	<i>bla_{OXA-58like}-1</i>	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599 pb	
	<i>bla_{OXA-58like}-2</i>	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{VIM}-U</i>	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	780 pb	
	<i>bla_{VIM}-L</i>	TGCTACTCAACGACTGCGCG		
<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{IMP}-U</i>	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	488 pb	
	<i>bla_{IMP}-L</i>	ATAATTTGGCGGACTTTGGC		
<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{KPC}-F</i>	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	589 pb	
	<i>bla_{KPC}-R</i>	TTTTCAGAGCCTTACTGCC		
<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{NDM}-F</i>	CATTTGCGGGGTTTTTAATG	998 pb	
	<i>bla_{NDM}-R</i>	CTGGGTTCGAGGTCAGGATAG		

5.2.1.2.2. Polymerase Chain Réaction (PCR) en temps réel

A. Principe

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus très utilisée dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée d'une part sur l'amplification des acides désoxyribonucléiques (ADN) par une ADN polymérase, à partir d'amorces sens et anti-sens, et d'autre part sur la détection régulière et la quantification d'un signal fluorescent émis par une sonde TaqMan®, marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' porte le fluorophore émetteur « *reporter* » qui est un dérivé de la fluorescéine (FAM, TET, JOE, HEX ou VIC™). À l'extrémité 3', se trouve le fluorophore suppresseur « *quencher* » qui est habituellement un dérivé de la rhodamine (TAMRA). L'émission de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés tout au long de la réaction de PCR (figure 12. A).

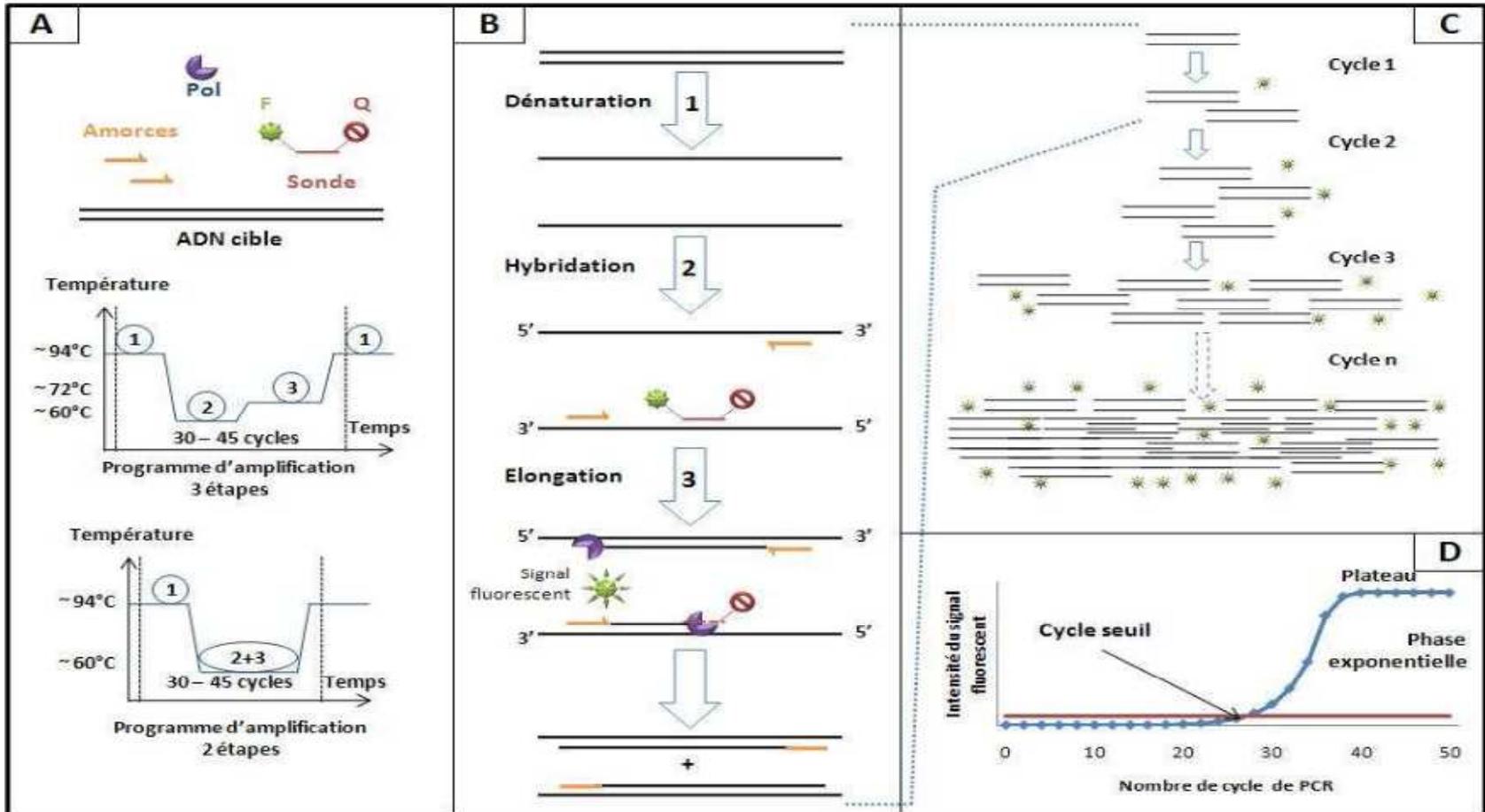
Un cycle de PCR, ou cycle d'amplification, est contrôlé par le changement de température de la réaction. Il est composé d'une étape de dénaturation de l'ADN, suivie de l'hybridation des amorces sur leurs séquences spécifiques et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase. Enfin, ces enzymes sont optimisées de façon à ce que les étapes d'hybridation et d'extension ont lieu à une température commune, réduisant ainsi le nombre d'étapes par cycle de PCR et augmentant donc la rapidité de la détection des ADN cibles (figure 12. A).

Lors de la dénaturation, les deux brins d'ADN sont séparés, puis les amorces se fixent sur leurs séquences cibles au cours de l'hybridation. Pendant l'élongation, la polymérase, qui possède une activité 5'-exonucléase, va cliver la sonde TaqMan®. Le fluorophore va donc s'éloigner du quencher, qui n'absorbera plus la fluorescence émise par le premier, et un signal pourra être détecté (figure 12. B).

L'amplification par PCR, corrélée à un nombre de fluorophore clivés (donc émettant un signal fluorescent) augmentant exponentiellement (figure 12. C).

Le résultat d'une PCR en temps réel est représenté graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes retraçant l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycle PCR.

Au début, le signal fluorescent émis ne se démarque pas du bruit de fond. Une phase exponentielle d'amplification du signal apparaît ensuite jusqu'à une phase plateau, correspondant au signal maximal détectable lorsque toutes les sondes ont été clivées. Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR (figure 12. D).



Pol = Polymérase, F = Fluorophore, Q = Quencher

Figure 12. Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®)

B. Réalisation et programme d'amplification

L'amplification est réalisée, dans une plaque de 96 puits BioRad blanche pour Thermocycleur Stratagene MX 3000P. 20 µl du mélange réactionnel (tableau 17), [contenant les amorces et les sondes spécifiques pour le dépistage des gènes codant pour la résistance aux carbapénemases (Tableau 18)], sont déposés dans chaque puits. La plaque est, ensuite, introduite dans le thermocycleur. L'amplification est réalisée selon le programme détaillé dans le tableau 19.

Des témoins positif et négatif sont inclus dans chaque série et trois répétitions sont effectuées pour chaque échantillon.

Tableau 17. Composition du mélange réactionnel pour les PCR en temps réel

Mix RT-PCR pour une réaction	Volume (en µl)
Quantitect Probe PCR Master Mix	10
Amorce F	0.5
Amorce R	0.5
Sonde	2
H ₂ O UP	2
ADN à amplifier	5
Volume total	20

Tableau 18. Amorces utilisées pour les PCR en temps réel des carbapénèmases

Gène	Amorce	Séquence des amorces	Taille du produit de PCR	Références
<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-23}-F</i>	TGCTCTAAGCCGCGCAAATA	130 pb	
	<i>bla_{OXA-23}-R</i>	TGACCTTTTCTCGCCCTTCC		
	<i>OXA23-probe</i>	FAM-GCCCTGATCGGATTGGAGAACCA-TAMRA		
<i>bla_{OXA-24}</i>	<i>bla_{OXA-24} -F</i>	CAAATGAGATTTTCAAATGGGATGG	123pb	Cette étude
	<i>bla_{OXA-24} -R</i>	TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT		
	<i>OXA24-probe</i>	FAM-GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA-TAMRA		
<i>bla_{OXA-58}</i>	<i>bla_{OXA-58} -1</i>	TTGCCCATCTGCCTTTTCAA	102pb	
	<i>bla_{OXA-58}-2</i>	CGCAGAGGGGAGAATCGTCT		
	<i>OXA58-probe</i>	FAM-GGGGAATGGCTGTAGACCCGC-TAMRA		
<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{KPC} -F</i>	TCTGGACCGCTGGGAGCTGG	398 pb	[288]
	<i>bla_{KPC} -R</i>	TGCCCGTTGACGCCCAATCC		
	<i>KPC-probe</i>	FAM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA		
<i>bla_{NDM1}</i>	<i>bla_{NDM1}-F</i>	GCGCAACACAGCCTGACTTT	155pb	[287]
	<i>bla_{NDM1}-R</i>	CAGCCACCAAAAAGCGATGTC		
	<i>NDM1-probe</i>	FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA		

Tableau 19. Programme de l'amplification de la PCR en temps réel

			40 cycles		
Température	50°C	95°C	95°C	60°C	45°C
Temps	2 min	5 min	1 sec	35 sec	30sec

5.2.2. Recherche moléculaire des résistances associées (aminosides et quinolones)

5.2.2.1. Résistance aux aminosides

Plusieurs gènes codant pour les enzymes modifcatrices des aminoglycosides sont étudiés en utilisant les amorces décrites dans le Tableau 20.

Tableau 20. Amorces utilisées pour les PCR standard des aminosides

Gène	Amorce	Séquence des amorces	Taille du produit de PCR	Références
<i>armA</i>	armA-F	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	590 pb	[289]
	armA-R	TCTCTTCCATTCCCTTCTCC		
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-IB- F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395 pb	[290]
	aac(6')-IB- R	CCCGCTTTCTCGTAGCA		
<i>aac(3)-Ia</i>	aac(3)-1A-F	GACATAAGCCTGTTCGGTT	372 pb	
	aac(3)-1A-R	CTCCGAACTCACGACCGA		
<i>ant (2')</i>	Ant (2')-F	GACACAACGCAGGTCACATT	524 pb	[7]
	Ant (2')-R	CGCATATCGCGACCTGAAAGC		
<i>aph(3')-VI</i>	aph(3')- F	CGGAAACAGCGTTTTAGA	716 pb	[290]
	aph(3')-R	TTCCTTTTGTTCAGGTC		
<i>rmtA</i>	rmtA-F	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC	635 pb	[289]
	rmtA-R	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC		
<i>aadA</i>	aadA-F	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812 pb	Cette étude
	aadA-R	TTGTACGGCTCCGCAGTG		

5.2.2.2. Résistance aux quinolones

La résistance aux quinolones est analysée en amplifiant les gènes *qnrA* et *qnrB*. Et ce, dans le but de détecter des mutations associées à la résistance aux quinolones dans l'ADN gyrase (Tableau 21).

Tableau 21. Amorces utilisées pour les PCR standard des quinolones

Gène	Amorce	Séquence des amorces	Taille du produit de PCR	Références
<i>qnrA</i>	qnrA-F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543 pb	[291]
	qnrA-R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA		
<i>qnrB</i>	qnrB-F	GACAGAAACAGGTTCCACCGGT	469 pb	
	qnrB-R	CAAGACGTTCCAGGAGCAACG		

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats de fréquences d'isolement des souches de *PMP*

1.1. Résultats globaux

Durant l'année 2011, sur 17834 prélèvements reçus au laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine pour subir une analyse bactériologique, 4173 se sont révélés positifs soit un taux de positivité global de 23,39%, dont 1,72 % sont des infections par des bactéries du groupe *PMP*, 1585 sont contaminés soit 8,88% (un prélèvement est déclaré contaminé si on isole 03 germes et plus). Les échantillons négatifs représentent 67,86% (12 076 échantillons) (figure 13).

Après identification par les méthodes conventionnelles, sur 4173 résultats positifs, 304 ont répondu aux critères d'identification des *PMP*. Quatre espèces ont été isolées. Ceci correspond à 7,28 % de l'ensemble des prélèvements positifs et à près de 1,7 % du total des prélèvements bactériologiques, confirmant ainsi que ces organismes sont relativement fréquents. Cette fréquence est beaucoup plus élevée que celle trouvée aux Royaume d'Arabie Saoudite où *Proteus spp* était responsable de 3% de l'ensemble des échantillons positifs [292]. Dans le même ordre O'Hara et al. [293] ont rapporté que *P. mirabilis* est responsable d'environ 3% des infections nosocomiales aux États-Unis et est souvent isolé dans les laboratoires de microbiologie clinique. Sekowska et al. [294] ont rapporté que les souches de *P. mirabilis* ont été isolées à partir de 4,3% de tous les microorganismes isolés à partir des urines, des plaies et des ulcères. D'autre part, Feglo et al. [295] ont rapporté un taux de prévalence proche de nos résultats avec 8,4% des espèces de *Proteus* recueillies à partir de différents échantillons cliniques.

1.2. Résultats selon l'espèce

Proteus mirabilis est l'espèce la plus fréquemment isolée et représente 70,06 % soit 213 souches de l'ensemble des *PMP* isolées, suivi par *Proteus vulgaris* avec une fréquence de 15,13 % (46 souches). *Morganella morganii* représente 10,19 % (31 souches) et *Providencia stuartii* 4,60 % (14 souches) (figure 13).

Au cours des infections causées par les *PMP*, *P. mirabilis* est toujours majoritaire, ce qui est justifié par le fait qu'il est le plus virulent de tous les *PMP* [137, 296]. Il représente, donc, l'agent étiologique le plus fréquent dans les infections communautaires et

nosocomiales, Ce qui peut être expliqué par le taux de portage élevé (25%) de ce germe dans le tube digestif humain. Les intestins sont bien le principal réservoir de ces bactéries chez l'homme, résultant de l'auto-infection ou de transmission de patient à patient dans les hôpitaux [297]. Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de certaines études réalisées dans le monde notamment en Allemagne [131], en Trinidad [298], en Angleterre, Pays de Galles, Irlande du Nord [299], au Ghana [295] et en Inde [300]. Cependant, l'étude de Kim et *al.* en Corée ont montré que *M. morgani* est l'espèce la plus isolée (46,21%), suivis par *P. mirabilis* (31,06%) et *P. vulgaris* (15,15%). Mais, cette étude a porté uniquement sur les isolats de bactériémie [301].

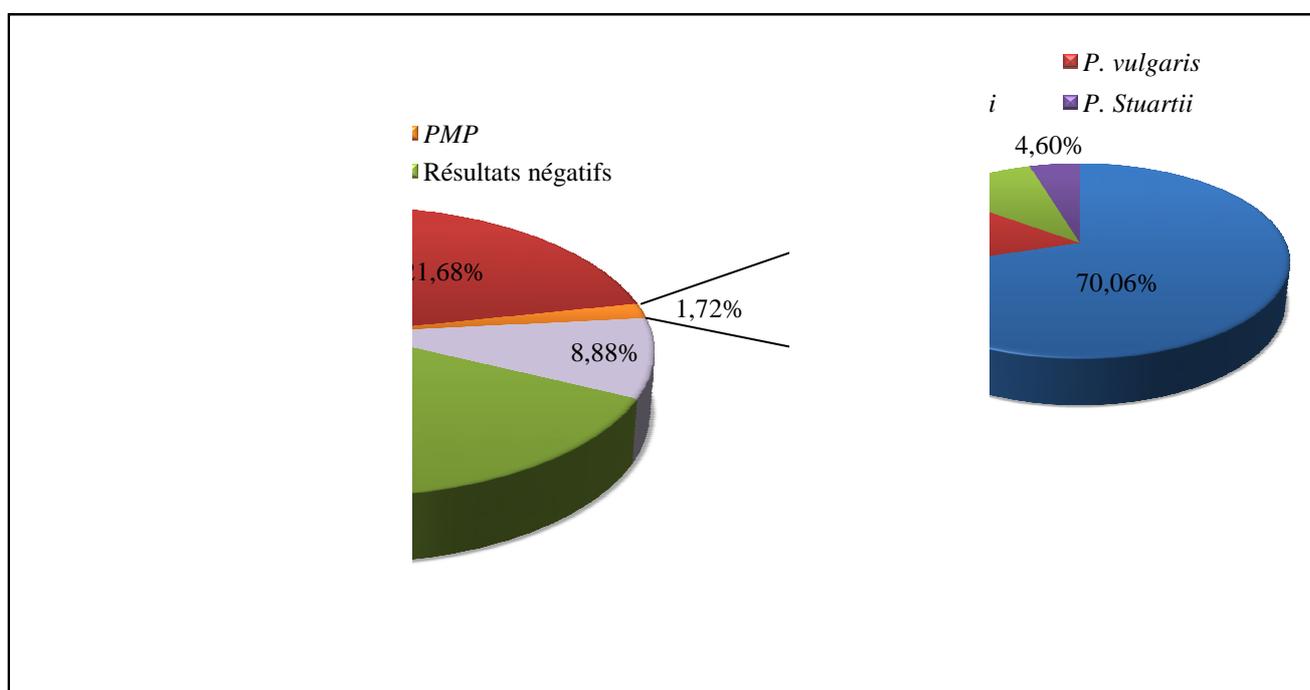


Figure 13. Résultats globaux et répartition de différentes espèces de *PMP* isolées.

1.3. Résultats selon le mois

L'étude de la distribution dans le temps des isolats de *PMP* selon le mois durant notre année de travail (figure 14) montre une augmentation des infections par les souches de *PMP* pendant la période hivernale avec :

- Un maximum de souches de *P. mirabilis* isolées en décembre (35 souches soit 87,5% du total de prélèvement des *PMP* dans ce mois).
- Un maximum de souches isolées au mois d'octobre pour *P. vulgaris* (8 souches soit 36,36 % du total de prélèvement des *PMP* dans ce mois).

- Au mois de septembre, un maximum de souches de *P. stuartii* ont été isolées (5 souches soit 17,24 % du total de prélèvement des *PMP* dans ce mois). Aucune souche n'a été isolée durant les mois d'avril, de juillet, d'octobre et de novembre.
- Pour *M. morganii*, un maximum de souches ont été isolées durant le mois de mars (5 souches soit 19,05% du total de prélèvement des *PMP* dans ce mois), mais aucune souche n'a été isolée durant les mois de juillet.

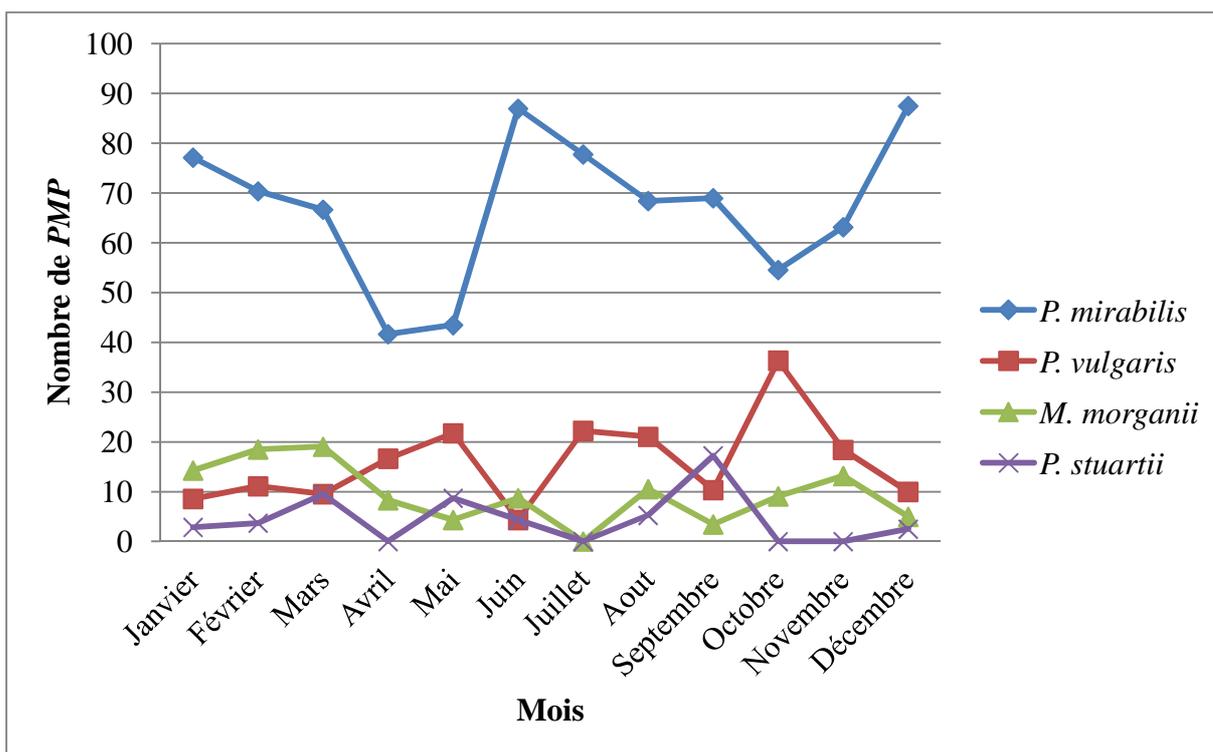


Figure 14. Distribution mensuelle des isolats de *PMP* (2011)

1.4. Résultats selon l'espèce et la nature de prélèvements

Les isolats de *PMP* ont été obtenus à partir de 14 spécimens différents, comme indiqué sur le Tableau 22 avec des taux élevés pour les prélèvements de pus (47,04 %) et d'urine (31,91 %).

P. mirabilis est l'espèce la plus fréquemment isolés à partir de tous les échantillons, à l'exception du cathéter, à partir duquel nous avons isolés 2 souches de *P. mirabilis* contre trois souches de *P. stuartii*, et du liquide céphalo-rachidien dans lequel un *P. vulgaris* a été mis en évidence.

P. mirabilis a été fréquemment isolé, avec des taux différents, à partir du pus (46,01%), de l'urine (33,33%), des sondes (6,10%) et du sang (5,63%). Quant à l'espèce *P. vulgaris*, elle a été largement isolée à partir du pus avec un taux important (67,39%), suivi des urines avec un taux plus faible, de l'ordre de 17,39%. Pour ce qui est de *M. morgani*, sa présence s'est avérée plus fréquente dans les urines (48,39 %). Enfin, *P. stuartii* a été identifié dans le pus à un taux de 35,71 %.

Tableau 22. Distribution des *PMP* selon la nature des prélèvements

Echantillon	Total		<i>P. mirabilis</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>M. morgani</i>		<i>P. stuartii</i>	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Pus	143	47,04	98	46,01	31	67,39	9	29,32	5	35,71
Urine	97	31,91	71	33,33	8	17,39	15	48,39	3	21,43
Sang	18	5,92	12	5,63	4	8,69	1	3,23	1	71,43
Sonde vésicale	18	5,92	13	6,10	1	2,17	4	12,90	0	0
Ponction trachéale	8	2,63	4	1,88	0	0	2	6,45	2	14,29
Catheter	5	1,64	2	0,94	0	0	0	0	3	21,43
Liquide d'ascite	3	0,98	2	0,94	1	2,17	0	0	0	0
Liquide péritonéale	3	0,98	3	1,41	0	0	0	0	0	0
Liquide pleural	2	0,65	2	0,94	0	0	0	0	0	0
Prélèvement vaginal	2	0,65	2	0,94	0	0	0	0	0	0
Ecoulement mammaire	2	0,65	2	0,94	0	0	0	0	0	0
Liquide gastrique	1	0,33	1	0,47	0	0	0	0	0	0
LCR	1	0,33	0	0	1	2,17	0	0	0	0
Cordon ombilical	1	0,33	1	0,47	0	0	0	0	0	0
Total	304	100	213	100	46	100	31	100	14	100

Nos résultats sont dans la même tendance avec de nombreuses études. Ils concordent avec des études similaires menées en Angleterre, Pays de Galles et Irlande du Nord [187, 302]. Les pus enregistrent le plus haut pourcentage des isolats de *PMP* (47,04%) et cela a confirmé les conclusions de Newman et al. [303] et Feglo et al. [295] au Ghana et Yah et al. [304] au Nigeria. Les *PMP* semblent être une cause fréquente d'infections de plaies en Afrique de l'Ouest, en contraste avec ceux de l'Europe et de l'Asie [298, 305] qui ont montré que *Proteus* est le plus communément rencontrés dans les urines que dans les autres échantillons cliniques.

En 2013, les études menées par A. Bahashwan et El Shafey [292] en Arabie Saoudite et Pandey et *al.* [300] en Inde, ont montré que les isolats de *Proteus* à partir de pus sont les dominants même en Asie.

1.5. Résultats selon l'origine

La répartition des souches selon leur provenance montre une prédominance des souches hospitalières par rapport aux souches communautaires. Ainsi, un total de 240 prélèvements positifs provient de patients hospitalisés soit un taux de 78,95 %, et 64 de patients en consultation externe soit 21,05 % (tableau 23). Un total de 161 *P. mirabilis* (75,59 %) ont été isolés à partir de patients hospitalisés alors que 52 (24,41 %) ont été isolés des patients externes. D'autre part, *P. vulgaris* a été isolé à partir de 42 patients hospitalisés, ce qui correspond à 91,30 % des cas et chez 4 patients externes (8,70%). En outre, 24 *M. morganii* (77,42 %) ont été isolés à partir de patients hospitalisés et 7 de patients externes (22,58%). Enfin, tous les isolats, sauf un, de *P. stuartii* ont été isolés chez des patients hospitalisés.

Tableau 23. Distribution des isolats de *PMP* selon l'origine de prélèvements

	Total		<i>P. mirabilis</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>M. morganii</i>		<i>P. stuartii</i>	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Infections hospitalières	240	78,95	161	75,59	42	91,30	24	77,42	13	92,86
Infections communautaires	64	21,05	52	24,41	4	8,70	7	22,58	1	7,14
Total	304	100	213	100	46	100	31	100	14	100

Les échantillons les plus fréquemment isolés de *PMP* chez les patients hospitalisés correspondent à du pus avec un taux de 55% (132 cas). Par contre, au cours des infections communautaires, c'est dans les urines que ces bactéries sont isolées le plus (76,57) (tableau 24).

Tableau 24. Distribution des *PMP* selon l'origine et la nature de prélèvements

Echantillon	Total		Infections hospitalières		Infections communautaires	
	No	%	No	%	No	%
Pus	143	47,04	132	55	11	17,19
Urine	97	31,91	48	20	49	76,57
Sang	18	5,92	18	7,5	0	0
Sonde vésicale	18	5,92	18	7,5	0	0
Ponction trachéale	8	2,63	8	3,33	0	0
Catheter	5	1,64	5	2,08	0	0
Liquide d'ascite	3	0,98	2	0,83	1	1,56
Liquide péritonéale	3	0,98	2	0,83	1	1,56
Liquide pleural	2	0,65	2	0,83	0	0
Prélèvement vaginal	2	0,65	1	0,42	1	1,56
Écoulement mammaire	2	0,65	1	0,42	1	1,56
Liquide gastrique	1	0,33	1	0,42	0	0
LCR	1	0,33	1	0,42	0	0
Cordon ombilical	1	0,33	1	0,42	0	0
Total	304	100	240	100	64	100

Cette tendance peut s'expliquer par le fait que les *PMP* se comportent en tant que pathogènes opportunistes et sont donc impliqués dans les maladies infectieuses, en particulier chez les personnes hospitalisées, immunodéprimés, paraplégiques ou avec des anomalies des voies urinaires [296, 306]. En Europe et en Amérique du Nord, entre 3 et 6% des infections imputables aux bactéries du genre *Proteus* sont acquises en milieu hospitalier [307].

1.6. Résultats selon le service

Sur les 240 isolements de patients hospitalisés, les services de médecine enregistrent le taux le plus important de souches de *PMP* avec une fréquence de 56,25%, suivis des services des urgences médicales (31,67%), des services de chirurgie (8,33%), des services de pédiatrie (2,92%). La proportion la plus basse est enregistrée au service de néonatalogie avec une fréquence de 0,83%. Cette prédominance des infections à *PMP* dans les services des patients âgés par rapport aux enfants est en accord avec la littérature, et peut s'expliquer par le fait que la présence des espèces de ce groupe est habituellement élevée chez les personnes âgées, et par conséquent le taux d'infection est supérieur chez ces

personnes, notamment chez les patients porteurs d'une sonde à demeure (cathétérisme de longue durée) ou traités par beaucoup d'antibiotiques [137, 301]. La répartition des espèces de *PMP* isolées en fonction des services est illustrée dans le tableau 25 et la figures 15.

Tableau25. Répartition des prélèvements de patients hospitalisés en fonction des services et des espèces de *PMP*.

Services (Annexe 4)	Total		<i>P. mirabilis</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>M. morgani</i>		<i>P. stuartii</i>	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Services médicaux	135	56,25	79	49,07	34	80,95	17	70,83	5	38,46
Urgences médicales	76	31,67	63	39,13	4	9,53	4	16,67	5	38,46
Services chirurgicaux	20	8,33	15	9,32	2	4,76	2	8,33	1	7,69
Service de pédiatrie	7	2,92	3	1,86	1	2,38	1	4,17	2	15,39
Service de néonatalogie	2	0,83	1	0,62	1	2,38	0	0	0	0
Total	240	100	161	100	42	100	24	100	13	100

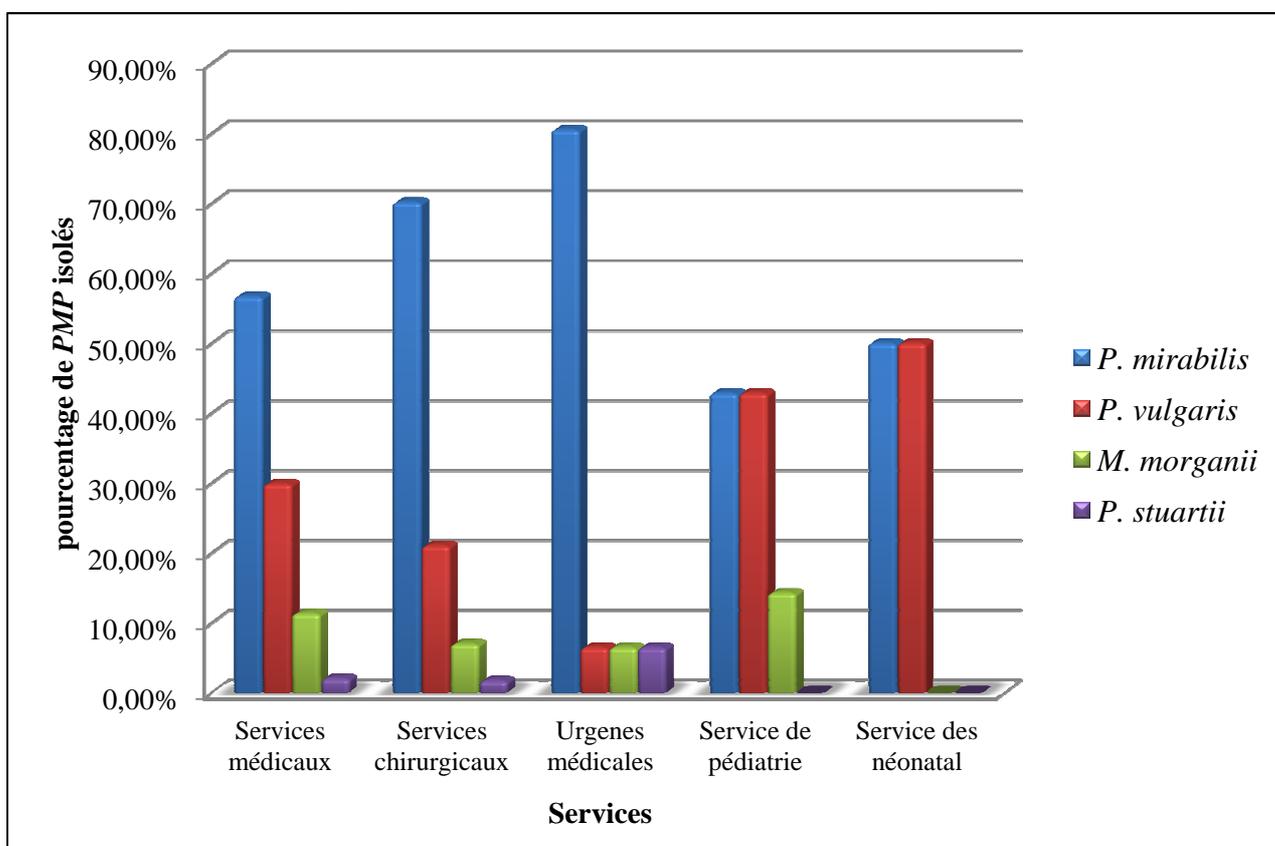


Figure 15. Répartition des espèces de *PMP* isolées en fonction des services.

1.7. Résultats selon le sexe

Les infections à *PMP*, principalement les infections urinaires, sont plus fréquentes chez les garçons que les filles prépubères, avec une incidence plus élevée chez les garçons non circoncis. Ceci est le résultat d'anomalies congénitales observées plus souvent chez les hommes dans l'enfance et l'adolescence [308]. Entre 20 et 50 ans, les infections sont 50 fois plus fréquentes chez la femme, en raison de la proximité du méat urinaire et de l'anus (périnée court) et de la brièveté de l'urètre qui de plus est large et s'ouvre lors des rapports sexuels. Mais après 50 ans l'incidence chez l'homme augmente nettement du fait de l'augmentation des maladies prostatiques, et le ratio est donc seulement 3/1 chez les sujets âgés [137].

Dans notre étude, nous constatons que 168 isolats (55,26%) proviennent des hommes alors que 136 (44,73%) sont isolés chez des femmes, avec un sex-ratio de 1,23. La fréquence des *PMP* est légèrement plus importante chez les patients de sexe masculin. L'infection à *P.mirabilis* a été détectée chez 109 hommes (51,17 %) et 104 femmes (48,83 %). D'autre part, *P. vulgaris* a été isolé chez 31 hommes (67,39 %) et 15 femmes (32,61 %). *M. morgani* a été isolé chez 17 hommes (54,84 %) et 14 femmes (45,16 %), et enfin, *P. stuartii* a été isolé chez 11 hommes (78,57 %) et 3 femmes (21,43 %) (Figure 16 et tableau 26).

Nos résultats ont montré que les hommes sont légèrement plus vulnérables que les femmes à acquérir les infections à différentes espèces de *PMP*. Cette légère prédominance masculine est expliquée précédemment sur la base du fait que le risque des infections des mâles est supérieur.

Cette répartition entre les sexes est différente de celle rapportée par Feglo et al.[295], qui rapportent que 43% des espèces de *Proteus* recueillies à partir d'échantillons cliniques proviennent de patients de sexe masculin et 57% de sexe féminin.

A.Bahashwan et El Shafey [292] rapportent qu'en Arabie Saoudite, 75% des isolats de *Proteus* proviennent de patients de sexe masculin. Alors que, Pandey et al. [300] rapportent qu'en Inde, 67,85% des souches sont isolées chez des patients de sexe masculin.

L'homme serait, donc, plus vulnérables que la femme à acquérir les infections à *Proteus* en Asie qu'en Afrique.

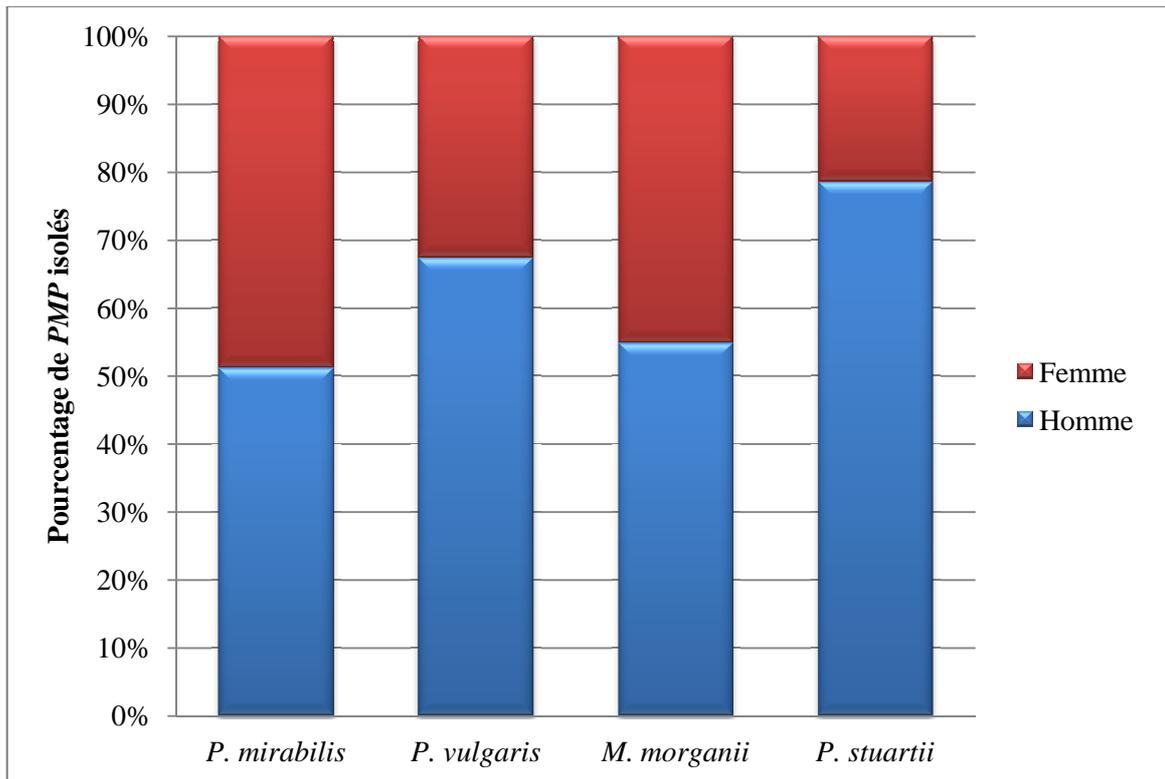


Figure 16. Répartition des espèces de *PMP* isolées en fonction du sexe.

Le tableau 26, récapitule tous les résultats épidémiologiques.

Tableau 26. Répartition des espèces de *PMP* isolées à partir de divers échantillon et en fonction de type du traitement.

		Espèces																			
		<i>P. mirabilis</i>					<i>P. vulgaris</i>					<i>M. morgani</i>					<i>P. stuartii</i>				
Echantillon	No	Interne		Externe		Total	Interne		Externe		Total	Interne		Externe		Total	Interne		Externe		Total
		♂	♀	♂	♀		♂	♀	♂	♀		♂	♀	♂	♀		♂	♀	♂	♀	
Pus	143	56	33	4	5	98	20	9	0	2	31	8	1	0	0	9	4	1	0	0	5
Urine	97	10	22	17	22	71	5	1	2	0	8	2	6	3	4	15	2	0	0	1	3
Sang	18	5	7	0	0	12	3	1	0	0	4	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Sonde vésicale	18	8	5	0	0	13	1	0	0	0	1	2	2	0	0	4	0	0	0	0	0
Ponction trachéale	8	3	1	0	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1	1	0	0	2
Catheter	5	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
Liquide d'ascite	3	0	1	1	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liquide péritonéale	3	2	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liquide pleural	2	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prélèvement vaginal	2	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ecoulement mammaire	2	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liquide gastrique	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LCR	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cordon ombilical	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	304	87	74	22	30	213	29	13	2	2	46	14	10	3	4	31	11	2	0	1	14
		161	52	42	4		24	7	13	1											

2. Caractérisation des méthodes d'identifications de *PMP*

Sur les 304 souches de *PMP* isolées, 108 souches ont fait l'objet d'une identification moléculaire. L'identification grâce aux galeries API 20E et celle réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Microflex) sont comparées à l'identification grâce à la méthode de référence qui est le séquençage de gène ADNr 16S (qui représente le 100%).

Le système Api 20E a permis d'identifier 97 (89,81%) souches du genre *Proteus*, dont 91 (93,81%) ont été identifiés comme étant des *P. mirabilis* et 6 (6,19%) comme étant des *P. vulgaris*. D'autre part, 10 isolats ont été identifiés comme étant des *M. morganii* ce qui correspond à 9,25% du total des isolats et une seule souche comme étant *P. stuartii* (0,92% du nombre total d'isolats). En comparaison avec le séquençage de gène ADNr 16S, le système API 20E a correctement identifié 101 (91,81 %) des isolats au niveau de l'espèce et 4 (3,63%) des isolats au niveau du genre. Un pourcentage de 8 (7,27) % des isolats étaient des erreurs d'identification par le système API 20E.

Par ailleurs, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a correctement identifié 98 (90,74%) souches à l'espèce *P. mirabilis* et 4 (3,70%) à l'espèce *P. vulgaris*. Par contre, 5 (4,62%) souches ont été identifiées par MALDI-TOF MS à l'espèce *M. morganii* et une seule souche a été identifiée à l'espèce *P. stuartii* (0,92%). Pour 94,44 % du total des espèces isolées, les résultats de MALDI-TOF MS étaient identiques à ceux obtenus avec le système API 20E. Les résultats discordants entre le système API 20E et MALDI-TOF MS ont été observé pour 5,56% du total des isolats. Statistiquement, la MALDI-TOF MS est plus performante que le système API 20E pour l'identification des espèces ($p < 0,0000001$).

Le séquençage de gène ADNr 16S a confirmé l'identification par MALDI-TOF MS à l'exception de 3 souches identifiées par MALDI-TOF MS comme *P. mirabilis*, alors qu'elles sont identifiées après séquençage du gène ADNr 16S comme des *P. vulgaris*. D'autre part, l'API 20E a identifié une souche des trois comme *P. mirabilis* et les deux autres souches comme *P. vulgaris*. L'antibiogramme montre que ces 2 derniers isolats contiennent deux populations différentes différenciées autour des disques de C3G (ce point va être développé plus tard). La nouvelle identification par MALDI-TOF MS de ces deux populations a montré que les 2 isolats contiennent vraiment deux souches différentes dont les souches sensibles ont été identifiées comme *P. mirabilis* et les résistantes ont été

identifiées comme *P. vulgaris*, le résultat a été confirmé par la méthode moléculaire en utilisant le séquençage du gène ADNr 16S et *rpoB* (Tableau 27).

Dans l'ensemble, en comparaison avec la méthode moléculaire, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été en mesure d'identifier correctement 100 % des isolats testés, avec 99.09% d'identification correctes au niveau de l'espèce, avec de très bons scores de l'ordre de 1,9 et 2,3. Un pourcentage de 0.90 % est limité à une identification au niveau du genre soit une seule souche (souche 68, représentée sur la figure 17) de *P. vulgaris* identifiée par MALDI-TOF comme *P. mirabilis*. Ces résultats sont en accord avec les rapports précédents (détaillé dans le tableau 28) étudiant l'efficacité de la spectrométrie de masse dans l'identification des entérobactéries à l'aide du MALDI-TOF MS (Microflex™, Bruker Daltonic, Bremen, Germany) [309-313] avec plus de précision et plus de rapidité que les techniques classiques.

Tableau 27. Confirmation de l'identification des deux souches contenant une double population.

No	API 20 E	MALDI TOF MS		ADNr 16S			<i>rpoB</i>		
	Id	Id	Score	Id	Taille	Id(%)	Id	Taille	Id(%)
S 93	<i>P.vulgaris</i>	<i>P.mirabilis</i>	2,14	<i>P. mirabilis</i>	1498	100	<i>P. mirabilis</i>	1097	99,63
		<i>P. vulgaris</i>	2,02	<i>P. vulgaris</i>	1510	99,66	<i>P. vulgaris</i>	1050	99,19
S 100	<i>P.vulgaris</i>	<i>P.mirabilis</i>	2,03	<i>P. mirabilis</i>	1501	100	<i>P. mirabilis</i>	1094	99,70
		<i>P. vulgaris</i>	2,10	<i>P. vulgaris</i>	1499	99,66	<i>P. vulgaris</i>	1043	99,39

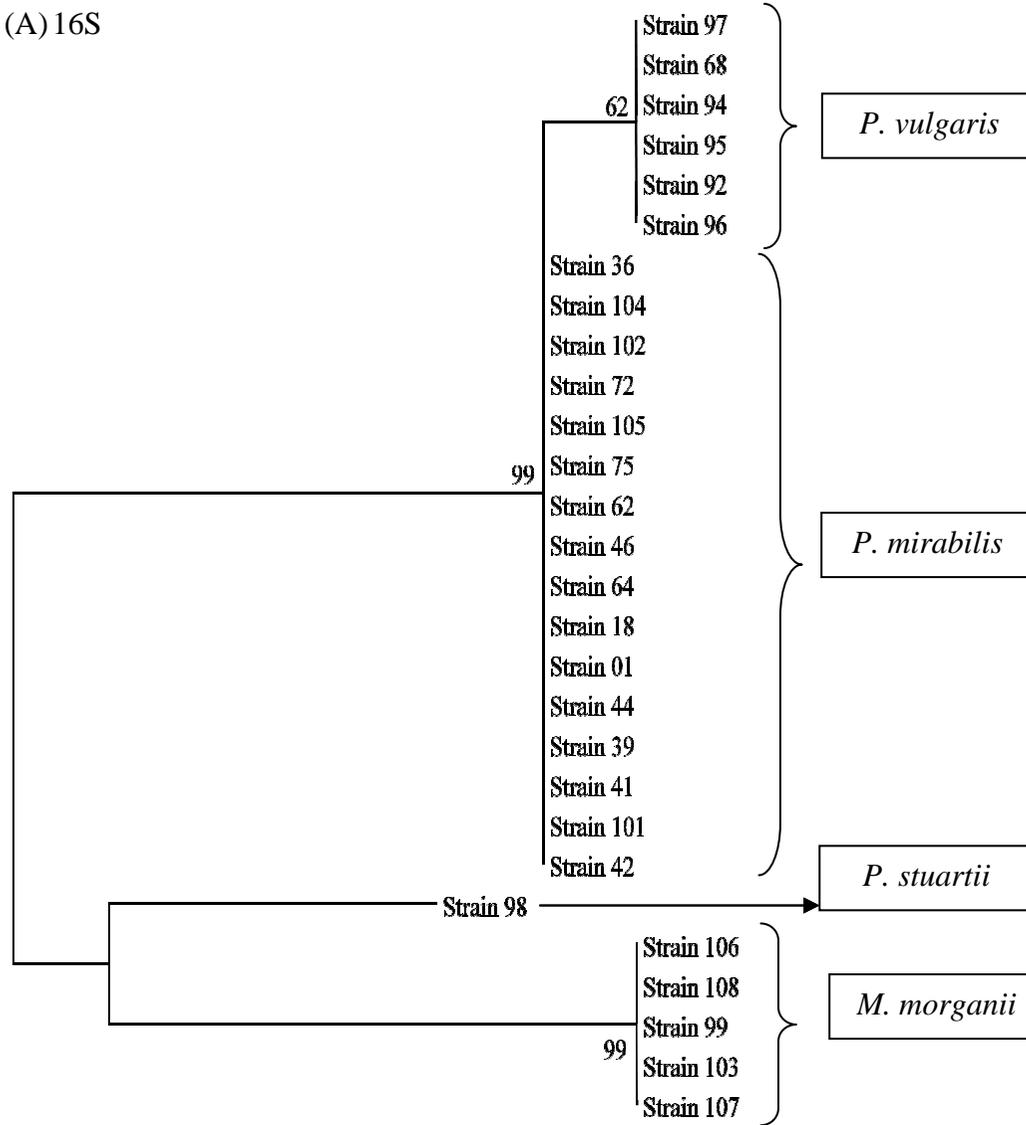
Lorsque on compare nos résultats avec ceux obtenus dans l'étude la plus récente de l'identification d'une grande population du groupe *PMP*, parmi une série d'entérobactéries identifiées par spectrométrie de masse de bio Mérieux VITEK MS (bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France) (qui a le même principe avec le MALDI-TOF MS de Bruker) [314], nous constatons que le taux d'erreur d'identification entre le VITEK MS et ADNr 16S pour les *PMP* a été de 100% pour *P. vulgaris*, correspondant à 23 souches, dans lesquelles VITEK MS a identifié ces souches au niveau du genre, mais pas au niveau de l'espèce. Alors que

nos résultats obtenus avec le MALDI TOF nous ont permis de constater une seule erreur d'identification pour *P. vulgaris*.

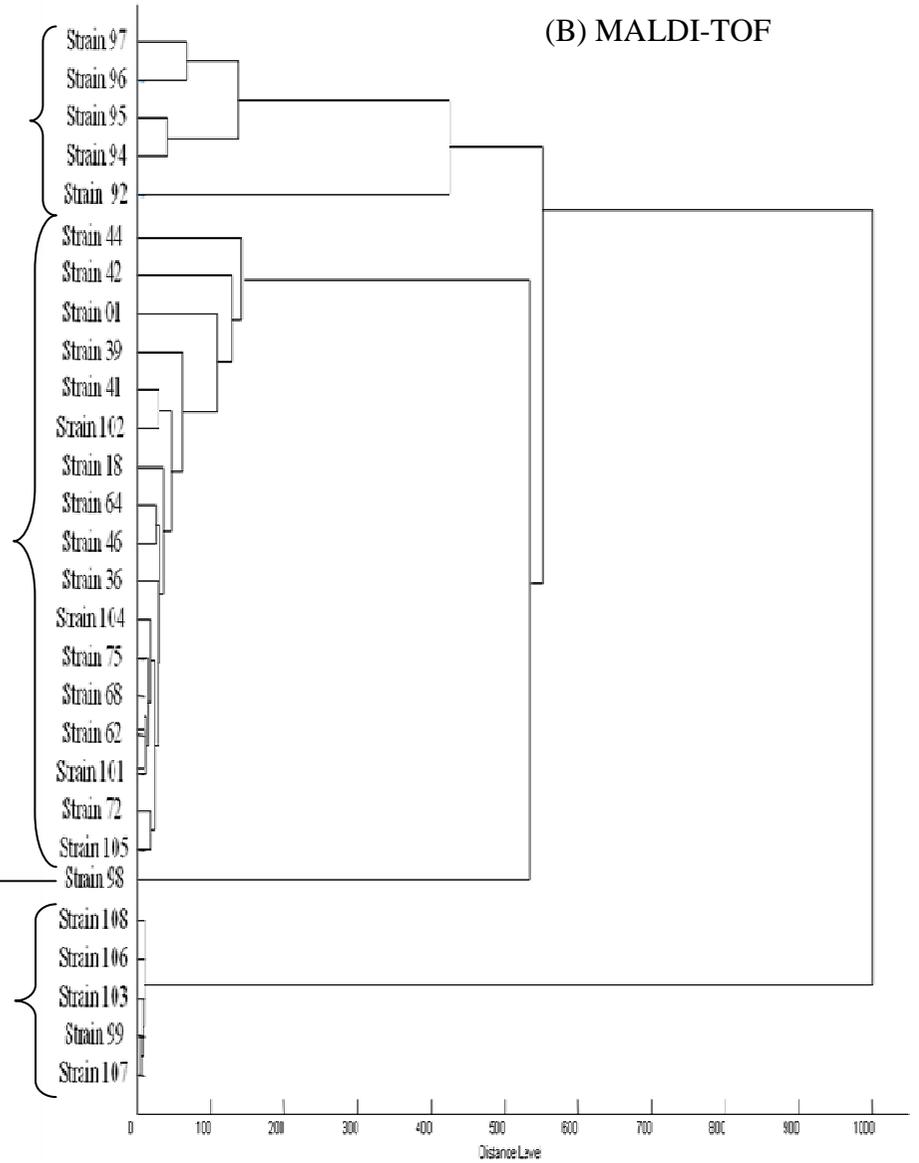
Bien que les deux systèmes donnent une identification bactérienne quelques minutes après la culture en utilisant la même matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) pour les deux systèmes, dans lequel 24 isolats peuvent être identifiés en moins d'une heure, au lieu de plusieurs heures ou des jours prenant l'identification des isolats par les méthodes biochimiques et moléculaires, on en déduit que le MALDI-TOF MS (MicroflexTM, Bruker Daltonic, Bremen, Germany) est beaucoup plus précis dans l'identification des *PMP* que le VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Cela pourrait être une méthode rapide et alternative pour mieux étudier l'épidémiologie de ces bactéries, afin de mettre en œuvre des mesures rapides de contrôle des infections.

La précision de l'identification par API 20E et par MALDI-TOF MS par rapport au séquençage de gène ADNr 16S est représentée dans le tableau 29. Les arbres phylogénétiques construits avec les résultats du MALDI- TOF MS et les résultats de séquençage de gène ADNr 16S sont présentés sur la figure 17.

(A) 16S



(B) MALDI-TOF



ΔDNr 16S (A) et MALDI-TOF MS

Tableau 28. Comparaison des résultats d'identification par API 20E et MALDI-TOF MS avec celles du séquençage de l'ADNr 16S

Espèce	Nb. des isolats	No. (%) des isolats identifiés par API20E					No. (%) des isolats identifiés par MALDI-TOF				
		Identification correcte			Erreur d'identification		Identification correcte			Erreur d'identification	
		Espèce	Genre	total	Espèce	Genre	Espèce	Genre	total	Espèce	Genre
<i>P. mirabilis</i>	97	90 (92,78)	2 (2,06)	92 (94,85)	2 (2,06)	5 (5,15)	97 (100)	-	97 (100)	-	-
<i>P. vulgaris</i>	7	6 (85,71)	1 (14,28)	7 (100)	1 (14,28)	-	6 (85,71)	1 (14,28)	7 (100)	1 (14,28)	-
<i>M. morgani</i>	5	5 (100)	-	5 (100)	-	-	5 (100)	-	5 (100)	-	-
<i>P. stuartii</i>	1	1 (100)	-	1 (100)	-	-	1 (100)	-	1 (100)	-	-
Total	110	101(91,81)	4(3,63)	105(95,45)	3(2,72)	5(4,55)	109(99,09)	1(0,90)	110(100)	1(0,90)	-

Tableau 29. Comparaison des résultats de MALDI-TOF MS de notre étude avec les résultats obtenus de la littérature.

Année	Machine	Organismes	No des isolats	Identification correcte (%)		Erreurs d'identification (%)	Références
				Espèces	Genres		
2002	MALDI II (Kratos Analytical, Manchester, UK)	<i>P. mirabilis</i>	5	80	100	20	[315]
		<i>P. vulgaris</i>	5	100	100	-	
2010	MALDI TOF MS (Microflex™, Bruker Daltonic, Bremen, Germany)	<i>P. mirabilis</i>	32	100	100	-	[309]
		<i>M. morgani</i>	12	100	100	-	
2010	MALDI TOF MS (Microflex™, Bruker Daltonic, Bremen, Germany)	<i>P. mirabilis</i>	24	100	100	-	[310]
		<i>P. vulgaris</i>	7	85,7	100	14,3	
		<i>M. morgani</i>	19	100	100	-	
2010	MALDI TOF MS (Microflex™, Bruker Daltonic, Bremen, Germany)	<i>P. mirabilis</i>	42	100	100	-	[311]
		<i>P. vulgaris</i>	9	100	100	-	
		<i>M. morgani</i>	22	100	100	-	
2011	MALDI TOF MS (Microflex™, Bruker Daltonic, Bremen, Germany)	<i>P. mirabilis</i>	22	100	100	-	[312]
		<i>M. morgani</i>	6	100	100	-	
2012	MALDI TOF MS (Microflex™, Bruker Daltonic, Bremen, Germany)	<i>P. mirabilis</i>	7	100	100	-	[313]
		<i>P. vulgaris</i>	3	66,7	100	33,3	
		<i>M. morgani</i>	2	100	100	-	
2013	VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)	<i>P. mirabilis</i>	58	98,3	-	1,7	[314]
		<i>P. vulgaris</i>	23	-	100	100	
		<i>M. morgani</i>	52	100	-	-	
		<i>P. stuartii</i>	31	100	-	-	
2013	MALDI TOF MS (Microflex™, Bruker Daltonic, Bremen, Germany)	<i>P. mirabilis</i>	97	100	100	-	Notre étude
		<i>P. vulgaris</i>	7	85,71	100	14,29	
		<i>M. morgani</i>	5	100	100	-	
		<i>Pr. stuartii</i>	1	100	100	-	

3. Antibio-résistance des souches de *PMP*

3.1. Profils de résistance globale aux antibiotiques des 304 souches de *PMP* isolées

En plus de la résistance naturelle (chromosomique) de tout les *PMP* à la colistine, *P. vulgaris* produit une céphalosporinase chromosomique de base. Il présente, donc, naturellement une résistance aux aminopénicillines, aux céphalosporines de 1ère génération et une sensibilité aux associations d'aminopénicillines et d'inhibiteurs. *M. morgani* et *P. stuartii*, par contre, produisent une céphalosporinase de type AmpC. Leur phénotype de résistance est marqué par une résistance aux aminopénicillines seules ou associées aux inhibiteurs et une résistance aux céphalosporines de 1ère génération. Par ailleurs, *P. mirabilis* appartient au groupe 0 qui ne possèdent aucun gène codant pour une β -lactamase et donc naturellement sensibles à toutes les β -lactamines testées [316].

Un examen du profil de résistance aux antibiotiques des isolats provenant des différents échantillons cliniques ont montré que toutes les souches sont sensibles à l'imipénème et résistantes à la colistine (tableau 30).

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques de chacune des espèces étudiées, on note que :

- Sur l'ensemble des souches de *P. mirabilis* isolées, 61% sont multirésistantes. Ces souches présentent une résistance assez importante à toutes les classes d'antibiotiques, en particulier une sensibilité diminuée aux β -lactamines. Une résistance élevée est observée vis-à-vis de l'amoxicilline de l'ordre de 61% et la ticarciline ($\approx 55\%$), une résistance assez marquée est observé vis-à-vis de l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique ($\approx 33\%$) et des céphalosporines de première génération ($\approx 40\%$), cependant une faible résistance a été marqué aux céphalosporines de 3^{ème} génération soit environ 18%. Concernant les aminosides, on observe une résistance assez élevée pour la gentamicine d'environ 21% suivie par 18 % pour l'amikacine. Par ailleurs, vis-à-vis des fluoroquinolones, un taux de résistance de 25% a été noté pour la ciprofloxacine ; quant aux autres antibiotiques, une résistance élevée a été observé pour les sulfamides ($\approx 56\%$), le chloramphénicol ($\approx 45\%$) et l'acide nalidixique ($\approx 43\%$).

- *P. vulgaris* présente une résistance peu élevée aux différents β -lactamines avec de faibles taux aux céphalosporines de 3^{ème} génération (19%). Une résistance assez élevée est observée contre les aminosides et les fluoroquinolones.

- 38% de *M. morgani* sont résistant aux céphalosporines de 3^{ème} génération, 50% à la gentamicine et 36% résistent au ciprofloxacine.

- Chez *P. stuartii* 55% sont résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Ces souches ont un haut niveau de résistance pour les aminosides 73% pour la gentamicine et 75% pour l'amikacine. 27% résistent au ciprofloxacine.

Le dépistage systématique des souches productrices de BLSE selon la technique de test de synergie de double disque sur milieu gélosé, a permis de détecter que 18,09 % (N=55) de *P. mirabilis*, 19,57 % (N=9) de *P. vulgaris*, 19,35% (N=6) de *M. morgainii* et 14,29 % (N=2) de *P. stuartii* sont productrices de BLSE (tableau 30).

L'usage des antibiotiques s'est développé avec l'accroissement de la population et l'amélioration de la qualité des soins, où ils sont largement prescrits autant à titre curatif que préventif. Mais leur utilisation intensive a contribué à l'émergence de résistances bactériennes qui se sont développés à l'égard de la plupart des antibiotiques, constituant aujourd'hui une préoccupation sanitaire mondiale majeure. Le plus inquiétant est l'apparition de bactéries multirésistantes. Dans notre étude le taux de souches de *PMP* multirésistantes varie entre 61% et 93 %. Ces taux sont beaucoup plus élevés que ceux déclarés en Inde (28,12% de *P. mirabilis* et 36.84 % de *P. vulgaris* sont trouvée multirésistantes) [300].

Nous remarquons que nos taux de résistance sont concordants avec ceux rapportés en 2011 par le réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (AARN) pour les β -lactamines. Sauf que nos résultats montrent un taux plus élevés de résistance vis-à-vis des C3G, aminosides et fluoroquinolones (17,84%, 21,85%, 20,90% respectivement pour *Proteus spp.*).

Une attention particulière devrait être accordée à la résistance croissante des *Proteus* à de certains antibiotiques en particulier les C3G, l'amikacine, et les fluoroquinolones.

Donc, ces antibiotiques devraient être prescrits avec prudence pour traiter les cas d'infection à *Proteus*, tanque la multirésistance est possible d'être produite.

Selon le rapport d'évaluation correspondant à la période de Janvier 2011 à Décembre 2011, sur l'ensemble des souches de *Proteus spp.* testées à l'échelle national, 13,02% sont productrices de BLSE [317], par contre nos resultats présentent un taux beaucoup plus élevé de BLSE (varie de 14,29% et 19,57%).

Nos resultats montrent un niveau de resistance aux C3G beaucoup plus élevé que celui rapporté dans le monde.

Le programme *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)* 2013 qui a étudié l'évolution de la résistance aux antibiotiques aux Etats-Unis, a révélé que le taux de sensibilité aux C3G des souches de *Proteus* isolées dans cette région était de l'ordre de 98% durant l'année 2011[318].

Selon le rapport du Canadian Hospital Ward Antibiotic Resistance Surveillance (CANWARD) study de 2010-2012, un taux de 99,4% de sensibilité à la ceftazidime des souches de *P. mirabilis* et de 91,4% des souches de *M.morganii* ont été observés dans les hôpitaux de Canada [319].

Le dernier rapport du programme de Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) a montré une diminution significative de la sensibilité des souches de *P. mirabilis* au céfotaxime (de 92,6% à 81,7%) et la ceftazidime (de 100% à 95,2%) dans la dernière décennie à Taiwan (2002-2012). Ce rapport a révélé que 172/1157 souches produisent une BLSE [320].

Dans la région métropolitaine (Leeds et Bradford, Royaume-Uni), selon le rapport de surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des *Enterobacteriaceae* (2010-2012), le taux de resistance aux C3G, au ciprofloxacine et à la gentamicine chez les *Proteus* était <10% [321].

Notre taux global de BLSE est supérieur à ceux rapportés de *P. mirabilis* provenant du Royaume-Uni 2% [321], des Etats-Unis < 5% [318] et du Taiwan 8,2% [320]. Par ailleurs, 48,86% des isolats cliniques de *Proteus* sont producteurs de BLSE en Inde [300].

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette disparité : les facteurs épidémiologiques, socioéconomiques (pauvreté, hôpitaux surchargés, et l'hygiène hospitalière déficiente), ce qui entraîne des taux élevés de colonisation et d'infection. Ce dernier facteur est très important car les souches de *PMP* présentent une aptitude particulière à acquérir des plasmides déterminants la production de BLSE. En plus des facteurs suscités, l'utilisation massive des C3G expliquerait en partie le pourcentage élevé de production de BLSE en Algérie.

Nos souches présentent un taux de résistance élevé aux aminosides (entre 12,82 % et 75% pour l'amikacine et entre 20,90% et 72,72% pour la gentamicine). Le taux retrouvé dans notre étude est supérieur à celui rapporté dans d'autres pays pour la gentamycine (> 90% de sensibilité) aux États-Unis et au Canada [318, 319]. Au Taiwan et en Arabie Saoudite, la sensibilité aux aminosides présente un niveau plus bas (57,7% et 61,14% respectivement) [292, 320].

A. Bahashwan et El Shafey [292] ont signalé la diminution de la sensibilité des *Proteus* à la ciprofloxacine (67% de souches de *Proteus spp.* résistantes) dans leurs établissements en Arabie Saoudite, ces résultats sont beaucoup plus élevés des nôtres (24 à 36% de souches de *PMP* résistantes). Nos résultats sont aussi beaucoup plus faibles que ceux retrouvés aux États-Unis (entre 40% et 75% de souches de *PMP* résistantes) et au Taiwan (> 46,2%) [318, 320]. Mais sont beaucoup plus élevées que ceux trouvés au Canada (entre 7,3% et 8,6% de souches de *PMP* résistantes) [319].

La résistance élevée des *PMP* aux antibiotiques peut être un indicateur de l'augmentation des niveaux de résistance parmi les entérobactéries à cause de l'utilisation irrationnelle des antibiotiques, conduisant à une prévalence plus élevée de bactéries résistantes [322] qui est très commune dans les pays en développement comme l'Algérie. Ces espèces sont non seulement les causes possibles d'infections mais aussi des réservoirs potentiels de gènes de résistance qui pourraient être transférées à d'autres bactéries pathogènes. Les niveaux élevés de production de BLSE et de la multirésistance des isolats sont des indications d'une augmentation de la menace de résistances signalées par de nombreuses études [292, 295].

Ce problème de multirésistance est actuellement un problème crucial de santé publique, non seulement pour le bactériologiste, mais aussi pour le clinicien et pour

l'hygiéniste. En effet, ces BMR émergent, puis diffusent très rapidement, une concertation pluridisciplinaire s'impose pour enrayer leur dissémination hospitalière et/ou communautaire [323], mais en tout cas mondiale.

Tableau 30. Pourcentage de résistance aux antibiotiques des 304 souches de *PMP* isolées durant l'année 2011

	AMX	AMC	TIC	CZO	FOX	CTX	IMP	GEN	AMK	COL	NAL	CIP	SXT	CHL	MDR	BLSE
<i>P.mirabilis</i> (N= 213)	60, 80	32,87	54,17	39,41	0	18,09	0	20,90	17,53	*	42,62	24,86	55,74	44,19	61,03	18,09
<i>P. vulgaris</i> (N= 46)	*	41,38	35	*	2,17	20	0	32,5	12,82	*	45,95	26,67	60,53	34,29	67,39	19,57
<i>M. morgani</i> (N= 31)	*	*	52	*	52	37,93	0	50	23,08	*	62,96	36	72	64,29	87,09	19,35
<i>P. stuartii</i> (N= 14)	*	*	80	*	33,33	54,55	0	72,73	75	*	45,45	27,27	100	88,89	92,86	14,29

AMX: amoxicilline; AMC : amoxicilline + acide clavulanique; TIC: ticarcilline; CZO: céfazoline; FOX : céfoxitine; CTX : céfotaxime; IMP : imipénème; GEN : gentamicine; AMK : amikacine; COL : colistine; NAL : acide nalidixique; CIP : ciprofloxacine; SXT : triméthoprim + sulfaméthoxazole; CHL : chloramphenicol; MDR: Multi-drug resistance; BLSE: bêta-lactamases à spectre étendu ; * : Résistance Naturelle.

3.2. Profils de résistance globale aux antibiotiques des 110 souches de *PMP* sélectionnée

Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques pour les 110 souches sélectionnées sont résumés dans le tableau 31.

L'examen du profil de résistance aux antibiotiques des souches a montré des taux élevés de résistance aux C3G. *P. mirabilis* et *P. vulgaris* présentent les taux les plus élevés aux Céfotaxime (56,5% et 57% respectivement), Céftriaxone (56,38% et 53,33% respectivement) et au Céf tazidime (55,16% et 56,67% respectivement). *M. morgani* présente des taux plus faibles de l'ordre de 20%, cependant aucune résistance aux C3G n'a été détectée pour *P. stuartii*.

La résistance élevée au C3G est principalement liée à la production de BLSE. Les tests phénotypiques réalisés ont montré que 56,70% (soit 55 souches) de *P. mirabilis*, 57,14% (soit 4 souches) de *P. vulgaris* et 20 % (soit une souche) de *M. morgani* sont productrice de BLSE.

Les *PMP* montrent un haut niveau de résistance pour les aminopénicillines seules ou associées à l'acide clavulanique. Par ailleurs, pour les aminosides, l'amikacine et la gentamicine semblent être les antibiotiques les plus actifs sur les quatre espèces (seulement 9,38% et 10,42% de souches de *P. mirabilis* sont résistantes, alors qu'aucune résistance aux ces 2 antibiotiques n'a été détectée ni chez *P. vulgaris*, ni *M. morgani*, ni *P. stuartii*). Une résistance assez marquée a été observée au kanamicine (entre 15,63% et 20% sauf *P. stuartii* qui est une souche sensible) et au tobramicine (entre 33,33% et 54,16% sauf *M. morgani*, ni *P. stuartii* où aucune souche n'est résistante).

Une résistance assez élevée a été observée pour les fluoroquinolones (> 16% pour *P. vulgaris*, > 31% pour *P. mirabilis* et > 40% pour *M. morgani*), alors que la seule souche isolée de *P. stuartii* est résistante au ciprofloxacine et au pefloxacine ce qui donne le taux de 100%.

Une souche de *P. mirabilis* et 3 de *P. vulgaris* sont résistantes à l'imipénème soit des pourcentages de 0,91% et 2,73% respectivement (tableau 31, 32). Les antibiogrammes réalisés en Algérie ont révélé que toutes les souches sont sensibles à cet antibiotique. Cette contradiction des résultats est, probablement, due aux normes utilisées pour l'interprétation

des diamètres de l'antibiogramme. En effet, en Algérie, l'interprétation est réalisée selon les normes du CLSI qui stipule que, pour qu'une souche d'entérobactérie soit résistante à l'imipénème, le diamètre doit être ≤ 13 mm. Par contre les normes de la CASFM (normes appliquées pour l'interprétation des antibiogrammes des 110 souches, réalisés en France) indiquent qu'une entérobactérie est déclarée résistante à l'imipénème, si le diamètre est < 17 mm.

Pour la colistine, à laquelle la totalité des souches devrait être résistantes, nous avons remarqué la présence d'une double population différenciée autour des disques de C3G, dont l'une est sensible et l'autre est résistante et ce, sur deux boîtes provenant de deux patients différents. Afin de confirmer qu'il ne s'agissait pas d'une contamination, l'antibiogramme a été refait plusieurs fois à partir des tubes d'origines, conservées en double exemplaires, et le résultat obtenu était toujours le même.

Après purification et identification des souches obtenues à partir des deux patients (comme détaillée dans les tableaux 27 et 32), un autre antibiogramme a été réalisé pour chacune des 4 souches. Les résultats ont confirmé que ces deux prélèvements, qui proviennent de deux patients hospitalisés en médecine interne, contiennent deux bactéries appartenant au même genre qui sont *P. mirabilis* et *P. vulgaris*. La première est une souche sensible à tous les antibiotiques sauf aux aminopénicillines, à la ticarcilline en combinaison avec l'acide clavulanique (elle a le même spectre que la combinaison de l'amoxicilline avec acide clavulanique) et à la colistine, alors que la deuxième est une souche multi-résistante productrice de bêta-lactamases à spectre étendu, résistante à l'imipénème, et sensible à la colistine pour les deux prélèvements (figure 18).

Tableau 31. Pourcentage de résistance aux antibiotiques des 110 souches de *PMP* isolées

	AMX	AMC	FOX	CTX	CAZ	CRO	ATM	IMP	CN	K	TOB	AK	PEF	CIP	OFX	SXT	CT	BLSE	MDR
<i>P. mirabilis</i> (N= 97)	65,62	25	6,25	56,5	55,16	56,38	32,04	0,91	10,42	15,63	54,16	9,38	36,46	31,25	36,46	56,25	100	56,70	78.13
<i>P. vulgaris</i> (N= 7)	100	16,66	0	57	56,67	53,33	16,67	2,73	0	16,66	33,33	0	16,67	16,67	16,67	33,33	98,18*	57,14	83.33
<i>M. morgani</i> (N= 5)	100	100	0	20	20	20	0	0	0	20	0	0	40	40	80	80	100	20	100
<i>P. stuartii</i> (N= 1)	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	0	100

AMX: amoxicilline; AMC : amoxicilline/acide clavulanique; FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime; CAZ : céftazidime; CRO : céftriaxone;

ATM : Aztréonam; IMP : imipenème; CN : gentamicine; K : kanamicine; TOB : tobramicine; AK : amikacine; PEF : péfloxacine;

CIP : ciprofloxacine; OFX : ofloxacine; SXT : triméthoprim/sulfaméthoxazole; CT : colistine; BLSE: bêta-lactamases à spectre étendu; MDR:

Multi-drug resistance. * 2 souches de *P. vulgaris* sont sensibles à la colistine

Tableau 32. Caractéristiques des souches de double population et des deux autres souches résistantes à l'imipénème

	Souche 93 (double population)		Souche 100 (double population)		Souche 38	Souche 110
Type de prélèvements	Pus		Pus		Pus	Urine
Services	Médecine interne		Médecine interne		Chirurgie thoracique	Externe
Sexe	Homme		Homme		Homme	Homme
Date de prélèvements	15 / 03 / 2011		01 / 01 / 2011		30 / 06 / 2011	25 / 12 / 2011
API 20E	<i>P. vulgaris</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
MALDI-TOF MS	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
ADNr 16s	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
Résistance à l'imipénème et à la colistine	IMP = S CT = R	IMP = R CT = S	IMP = S CT = R	IMP = R CT = S	IMP = R CT = R	IMP = R CT = R
Type d'enzymes produits	/	<i>bla_{SHV-11}</i> , <i>bla_{TEM-2}</i> , <i>bla_{PER-1}</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')</i> , <i>aadA-1</i>	/	<i>bla_{TEM-2}</i> , <i>bla_{PER-1}</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')</i> , <i>aadA-1</i>	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>armA</i> , <i>aadA2</i>	<i>armA</i> , <i>aadA2</i>
Production de carbapénémases	/	Absence de gènes (PCR négative)	/	Absence de gènes (PCR négative)	<i>bla_{OXA-24}</i>	Contamination de l'échantillon
Hodg test	/	Négatif	/	Négatif	Négatif	Négatif
EDTA test	/	Négatif	/	Négatif	Négatif	Négatif
Test de conjugation	/	Négatif	/	Négatif	Positif	Positif

IMP : Imipénème, CT : colistine, S : sensible, R : résistant.

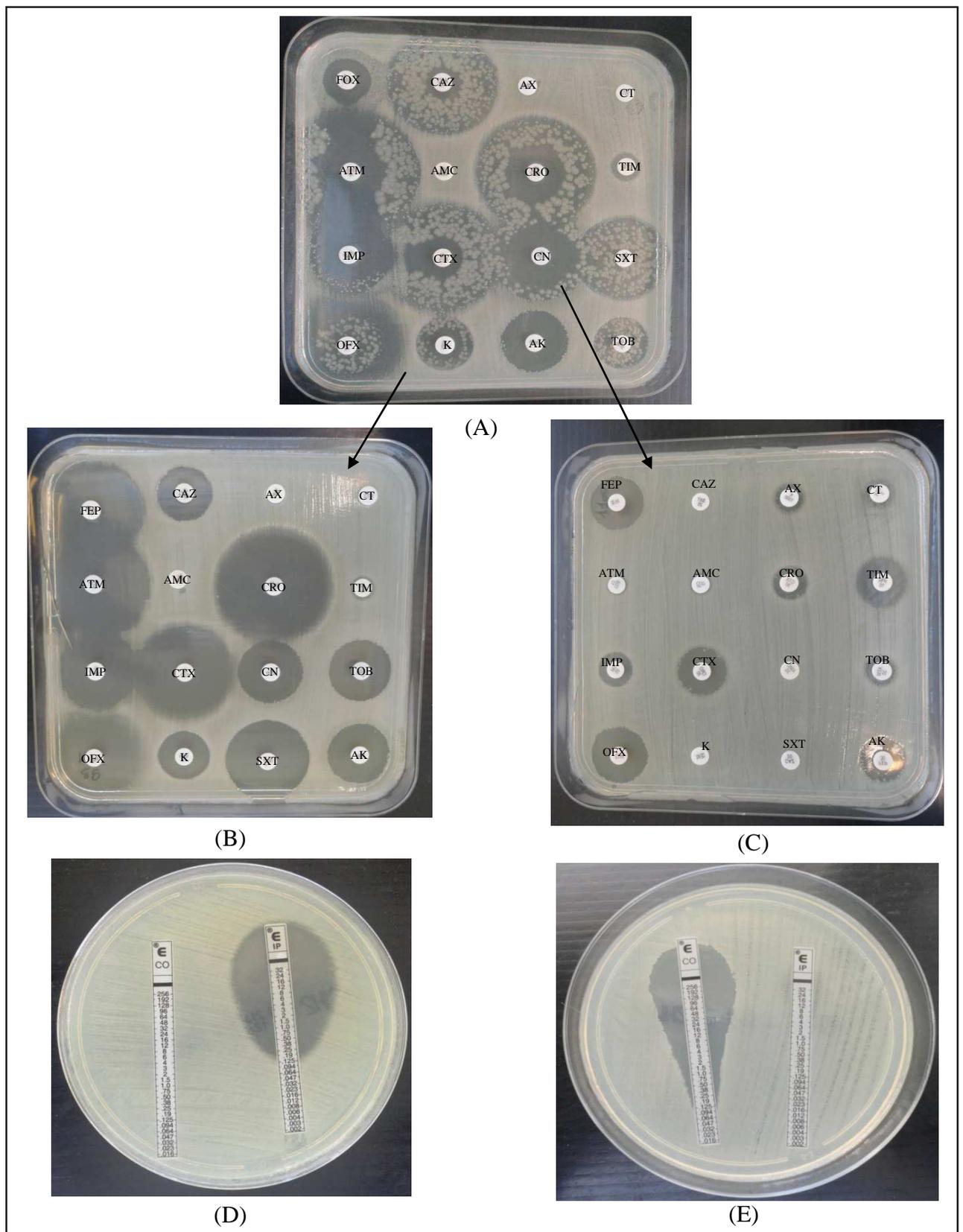


Figure 18. Antibiogramme et CMI par E-test pour les prélèvements à double population.

(A) ATB double population. (B) ATB souche sensible *P. mirabilis*. (C) ATB souche résistante *P. vulgaris*. (D) E-test *P. mirabilis*. (E) E-test *P. vulgaris*.

NB : le résultat est le même pour les 2 prélèvements 93 et 100.

3.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

Les valeurs absolues des CMI de l'imipénème des 3 souches *P. vulgaris* et de la souche *P. mirabilis* résistantes sont égales à 12mg/L pour toutes les souches (figure 19). C'est des niveaux très élevés de résistance. Par ailleurs, parmi ces mêmes souches, deux *P. vulgaris* sont sensible à la colistine avec des CMI de 0,125mg/L (figure 20).

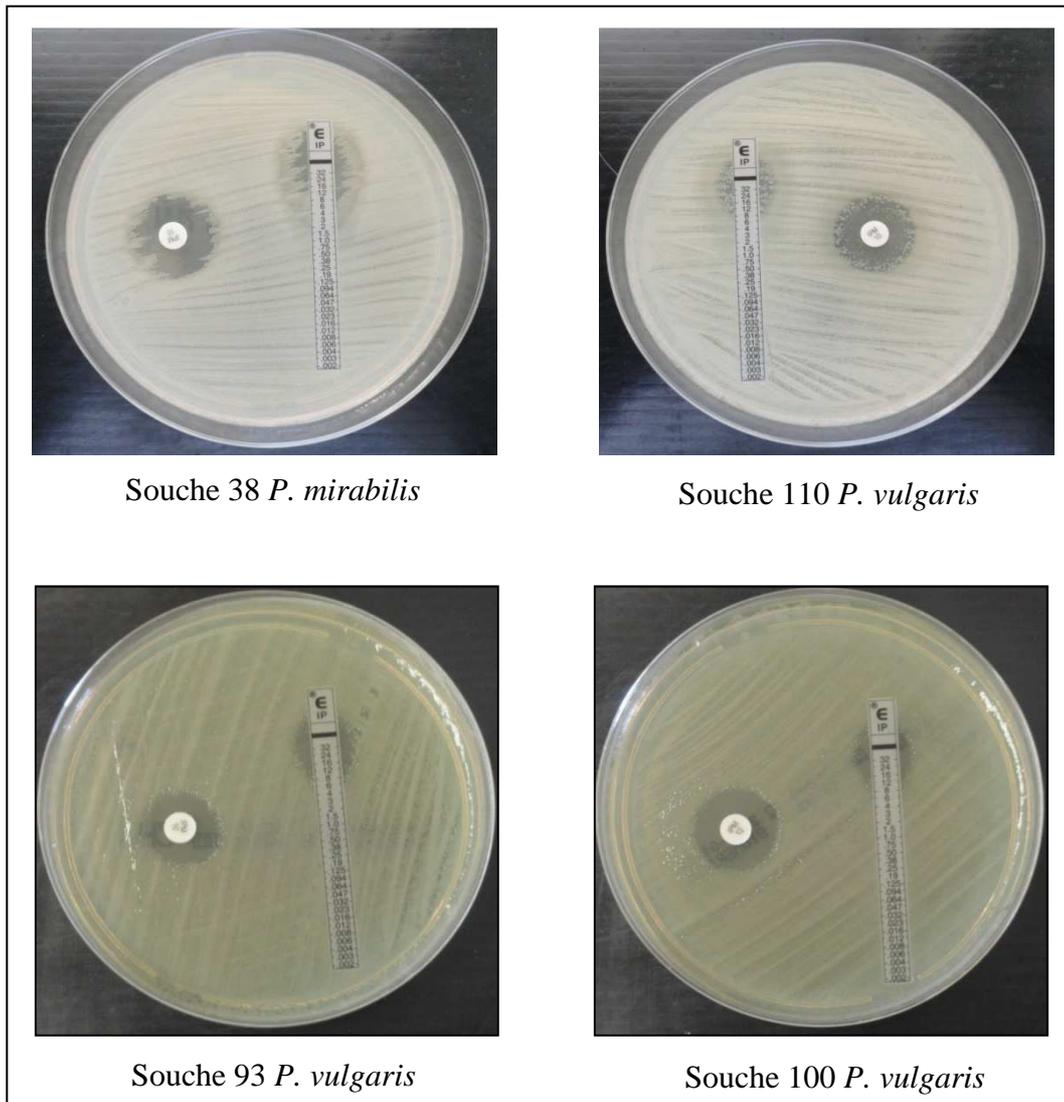


Figure 19. CMI par E-test imipénème des souches résistantes à l'imipénème.

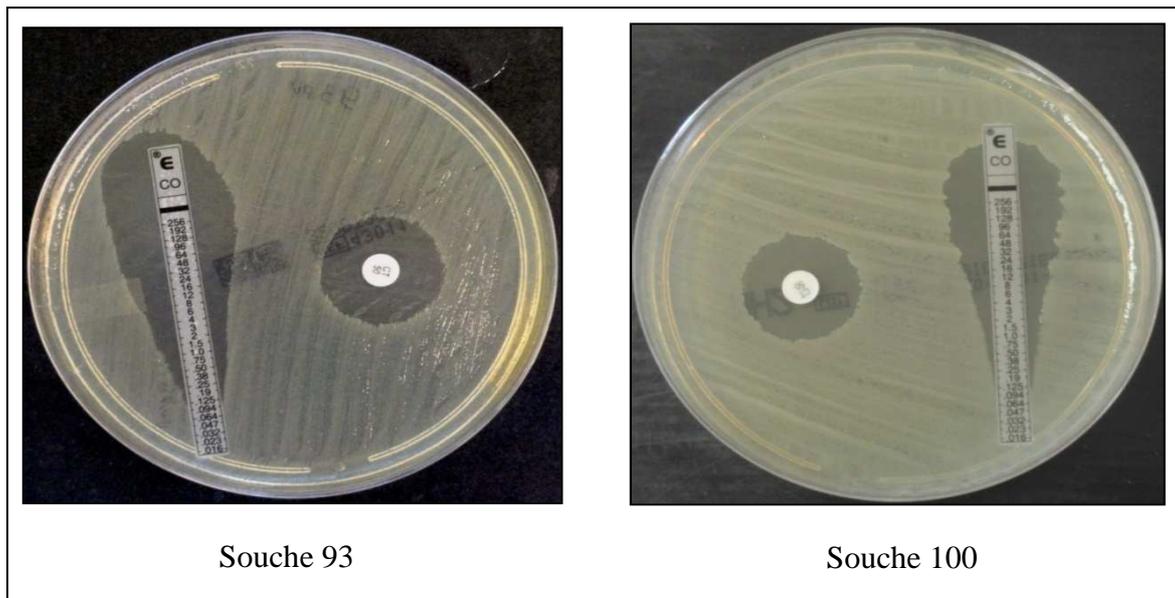


Figure 20. CMI par E-test colistine des souches *P. vulgaris* sensible à la colistine.

Deux mécanismes peuvent causer la résistance des entérobactéries aux carbapénèmes: (i) la production de carbapénémases qui appartiennent à différentes classes de β -lactamases (classification d'Ambler) : classe A (*KPC*), classe B (métalloenzymes *VIM*, *IMP*, *NDM*) et classe D (*OXA-48*, *OXA-23*, *OXA-181* et leurs variants) ou bien (ii) un défaut d'accumulation de l'antibiotique associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE suite à des modifications des PLP [324].

Comme les autres β -lactamines, les carbapénèmes exercent leur activité bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines de liaison des pénicillines (PLP). Il faut d'abord noter que les espèces du groupe *PMP*, notamment *Proteus mirabilis* et *Morganella morganii*, sont intrinsèquement moins sensibles aux carbapénèmes (notamment à l'imipénème) que les autres espèces d'entérobactéries à cause de PLP naturellement peu affines pour ces molécules. Une résistance acquise à l'imipénème (et au mércillinam) par mutation des PLP a été décrite chez *P. mirabilis* suite à une perte d'affinité de la PLP 2 et à une diminution de la quantité de PLP 1A. Cependant, ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez cette espèce bactérienne [42].

4. Recherche phénotypique des Carbapénémases

La détection phénotypique des carbapénémases est réalisée pour les 4 souches résistantes à l'imipénème grâce à 2 méthodes : le test de Hodge modifié et le test d'inhibition des métallo-enzymes par l'EDTA.

4.1. Test de Hodge modifié

Ce test est réalisé afin de chercher phénotypiquement la production des carbapénémases. Il est positif en cas de présence d'une déformation de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée, indiquant ainsi la présence d'une carbapénémase sans pouvoir identifier la carbapénémase en cause. Dans notre étude ce test est négatif pour les 4 souches testées (figure 21).

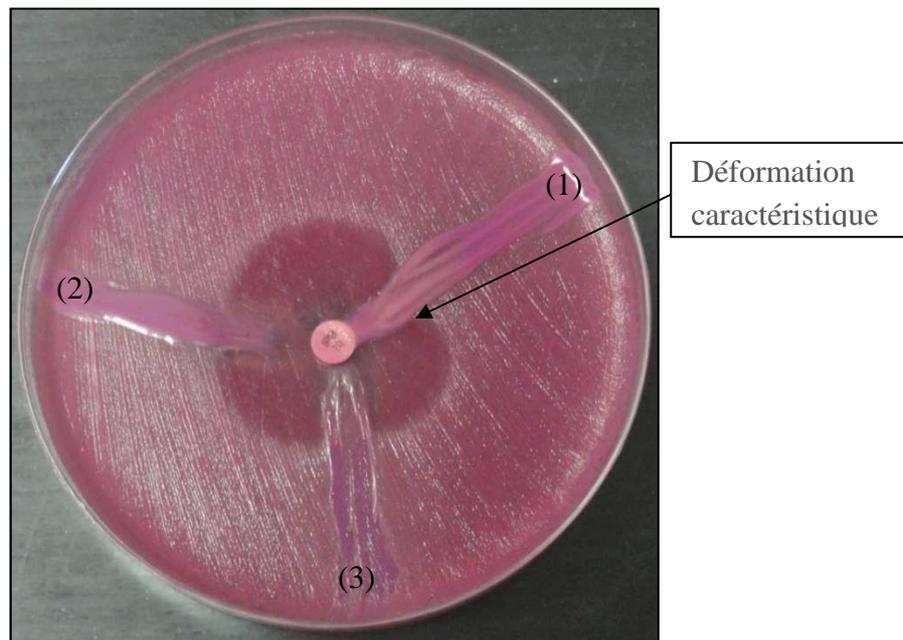


Figure 21. Test de Hodge négatif. (*Klebsiella pneumoniae* « Kpnasey » : témoin positif (1); *Klebsiella pneumoniae* : témoin négatif (2) ; Souche testée (3)

4.2. Test de synergie EDTA-IMP

Le résultat du test de synergie EDTA-IMP des 4 souches résistantes à l'imipénème nous montre, après une incubation de 24 heures à 37°C, que les souches ne sont pas

productrices d'une Métallo-Bêta-Lactamase (MBL) (figure 22), à cause de l'absence des images de synergie entre :

- Le disque d'imipénème et le disque d'imipénème avec de l'EDTA.
- Le disque d'imipénème et le disque vierge contenant de l'EDTA.

Puisque ce test permet de différencier entre les métallo- β -lactamases et les autres carbapénèmases de classe A ou D, et puisque jusqu'à ce jour, les propriétés enzymatiques des carbapénèmases de classe D n'ont pas permis le développement de tests phénotypiques spécifiques pour leur détection. La production de ces enzymes est suspectée même si les résultats de notre test EDTA sont négatifs. Ainsi, La méthode de référence pour la détection des carbapénèmases est l'amplification du gène codant pour la carbapénèmase.

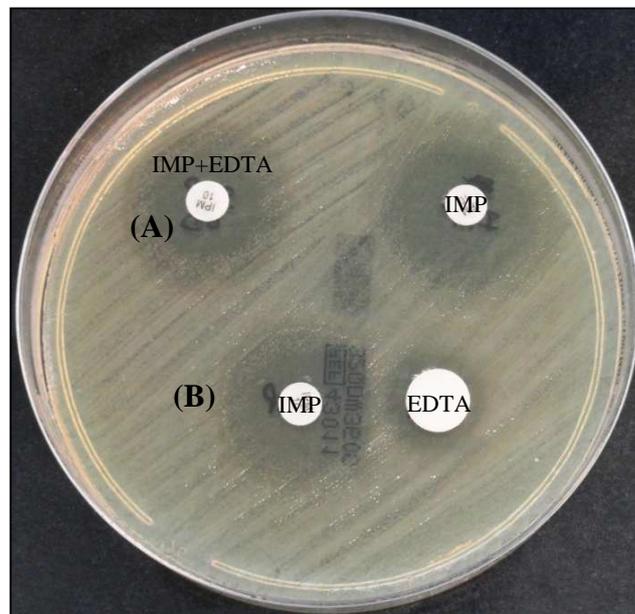


Figure 22. Test de synergie EDTA-IMP chez une souche résistante à l'imipénème. (A) deux disques d'imipénème dont l'un avec de l'EDTA. (B) disque d'imipénème et un disque vierge avec de l'EDTA.

5. Recherche moléculaire des gènes de résistance

La maîtrise de la résistance bactérienne aux antibiotiques est une priorité de santé publique qui nécessite des actions concertées, tant en médecine de ville que dans les établissements de santé. La prévention de la transmission croisée et la réduction de la

pression de sélection, par un usage rationnel des antibiotiques, en sont les deux composantes essentielles.

Durant la dernière décennie, un intérêt accru a été accordé aux bactéries à Gram positif résistantes aux antibiotiques. Cependant, les cliniciens et les microbiologistes accordent plus d'importance à l'émergence de résistance chez les bacilles à Gram négatif (BGN), considérant même qu'il s'agit d'une situation à haut risque de santé publique. En effet, d'une part la résistance des BGN augmente plus rapidement que les bactéries à Gram positif. D'autre part, il y a très peu d'antibiotiques en cours de développement pour parer à une telle situation.

La résistance liée à la production de β - lactamase à spectre étendu (BLSE) est un problème particulier dans le traitement des infections à *PMP* vue que les β -lactamines sont l'arme essentiel de lutte contre les infections à entérobactéries, mais d'autres mécanismes ont également émergé, conduisant à la multirésistance et menaçant de créer des espèces pan-résistantes. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des *PMP* est véhiculée par des gènes mobiles et des plasmides qui peuvent se propager très rapidement pour toucher plusieurs populations bactériennes.

Devant nos bactéries multi-résistantes il nous est apparu essentiel de rechercher les supports génétiques et le type de résistance selon la classification de Ambler (A,B et D).

Durant notre travail, nos résultats de supports génétiques nous a permis de mettre en évidence les différents profils génotypiques de résistances mentionnés dans les tableaux 33 et 34.

5.1. Recherche moléculaire des gènes codant pour des BLSE

Les résultats de l'amplification des gènes des *BLSE* par PCR standard ont montré que sur les 110 souches de *PMP* étudiées, 60 (54,55%) souches sont positives et produisent une ou plusieurs enzymes de BLSE (dont la même souche peut avoir plusieurs gènes à la fois) donnant ainsi 67 profils (Figures 23 à 26).

L'analyse des séquences nucléotidiques des produits de PCR purifiés des gènes des 60 souches positives a montré que :

- 10 (16,67%) souches de *P. mirabilis* sont productrices de *bla*_{CTX-M-15},

- 53 (88,33%) souches de *PMP* sont productrices de *bla_{TEM}*, dont 49 souches sont des *P. mirabilis* (avec 38 souches produit *bla_{TEM-1}* et 11 *bla_{TEM-2}*), 3 souches sont des *P. vulgaris* (avec 1 souche produit *bla_{TEM-1}* et 2 *bla_{TEM-2}*) et une souche de *M. morganii* productrice de *bla_{TEM-1}*,

- 3 (5%) souches de *P. vulgaris* sont productrices de *bla_{PER-1}*,

- 1 (1,67%) souche de *P. vulgaris* est productrice de *bla_{SHV-11}*.

- Aucune souche ne possède une β -lactamases de type *bla_{VEB}* et *bla_{GES}*.

Le support génétique des enzymes BLSE produits par les 60 souches de *PMP* isolées productrices de BLSE dans notre étude était varié. La majorité de nos BLSE sont dérivées des mutants de gène *bla_{TEM}*. Au cours des dernières années, plusieurs nouvelles BLSE de type non-*TEM* ont émergé, comme *bla_{CTX}*, *bla_{SHV}*, *bla_{SFO}*, *bla_{BES}*, *bla_{BEL}*, *bla_{TLA}*, *bla_{GES}*, *bla_{PER}* et *bla_{VEB}* [325].

- Dans notre série de souches, le support moléculaire principal expliquant la résistance de BLSE était la présence de gènes *bla_{TEM}* chez 53 souches dont 40 (75,74%) d'entre elles produisent une β -lactamase de type *TEM-1*. Nos résultats sont en accord avec ceux de Palzkill et Botstein qui rapportent que le gène *bla_{TEM-1}* (plasmidique) est le plus répandu chez les bactéries à Gram négatif [326]. Telle que rapportée dans la littérature, sa fréquence chez les *Enterobacteriaceae* peut dépasser les 61% [327].

- La présence du gène *bla_{SHV-11}* n'a été observée que chez une seule souche de *P. vulgaris*. Ce gène est différent par une substitution Leu-Gln sur l'acide aminé 35 par rapport au gène SHV-1, et diffèrent l'un de l'autre uniquement en position 1 du codons 238 et 240. Ce gène a été précédemment décrit chez *K. pneumoniae* [328, 329] **mais jamais chez une souche appartenant au groupe *PMP*.**

- La prévalence de β -lactamases de type *CTX-M* a augmenté de façon spectaculaire depuis 1992 [37], ce sont, probablement, les enzymes les plus répandues actuellement chez les entérobactéries [44]. Ces enzymes confèrent un haut niveau de résistance au céfotaxime plus qu'à la ceftazidime. Cependant, les BLSE de type *CTX-M* hydrolysant la ceftazidime ont été récemment rapportées, tels que *bla_{CTX-M-15}* ou *bla_{CTX-M-19}* [330].

Dans notre étude, 10 souches de *P. mirabilis* productrices de BLSE de type *CTX-M-15* ont été isolées. Ce gène est différent d'une paire de base (pb) par rapport au gène *bla_{CTX-M-3}* grâce à un seul changement d'acide aminé (Asp240 → Gly), il en résulte un nouveau gène *bla_{CTX-M}* [331]. Le *bla_{CTX-M-15}* a été décrit pour la première fois en Inde en 2001 [332]. il a ensuite été identifiée et semble être épidémique dans plusieurs pays : Pologne [331], Turquie [333], Royaume-Uni [334], Russie [335], Taïwan [336], Canada [337], France [338], Bulgarie [339], Portugal [340], Liban [341] et en Corée [342]. Les rapports concernant la présence de *bla_{CTX-M-15}* en Afrique, avant sa découverte en Algérie, étaient limités au Sénégal [343], en Tanzanie [344] et au Cameroun [345]. Pour l'Algérie, seule *bla_{CTX-M-3}* produite par *Salmonella enterica* sérotype Senftenberg a été rapporté en 2005 [346]. Mais en 2006, Touati et al. [330] ont décrit pour la première fois la présence de *bla_{CTX-M-15}* en Algérie chez deux entérobactéries (*E. coli* et *K. pneumoniae*), et ce n'est qu'en 2009 que cette enzyme a été retrouvée chez *P. mirabilis* à Alger, pour la première fois [347]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le transfert horizontal et la propagation de plasmides portant le *bla_{CTX-M-15}* chez les différents genres des *Enterobacteriaceae* ainsi que la dissémination clonale de microorganismes producteurs de ce gène.

- Les β-lactamases de type *bla_{PER}* ne sont pas très couramment identifiées [348], elles sont de plus en plus signalées, avec la découverte du gène *bla_{PER-1}*, qui a été identifiés chez plusieurs espèces à Gram-négatif, notamment *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* et *P. stuartii* [349-352]. Ce déterminant BLSE a été détecté dans plusieurs pays d'Europe, comme la France, la Pologne, le Kosovo [353] et l'Italie [350, 354] et est particulièrement répandu dans différentes espèces en Turquie [349]. Il a été également identifié en Corée chez *Providencia spp.* [351], et plus récemment, la propagation du gène *bla_{PER-1}* a été rapportée pour la première fois chez deux espèces d'entérobactéries, *P. vulgaris* et *P. stuartii*, isolées à Alger en 2009 [352] et depuis cette date aucun rapport sur des souches porteuses de ce gène n'a été publiée en Algérie jusqu'au 2011, au cours de notre travail, avec l'isolement de 3 souches de *P. vulgaris* productrices de *bla_{PER-1}*. Selon la littérature, cette enzyme est souvent codée par un plasmide, mais elle peut également être associée à des éléments transposables facilitant la diffusion rapide dans différentes populations bactériennes [349].

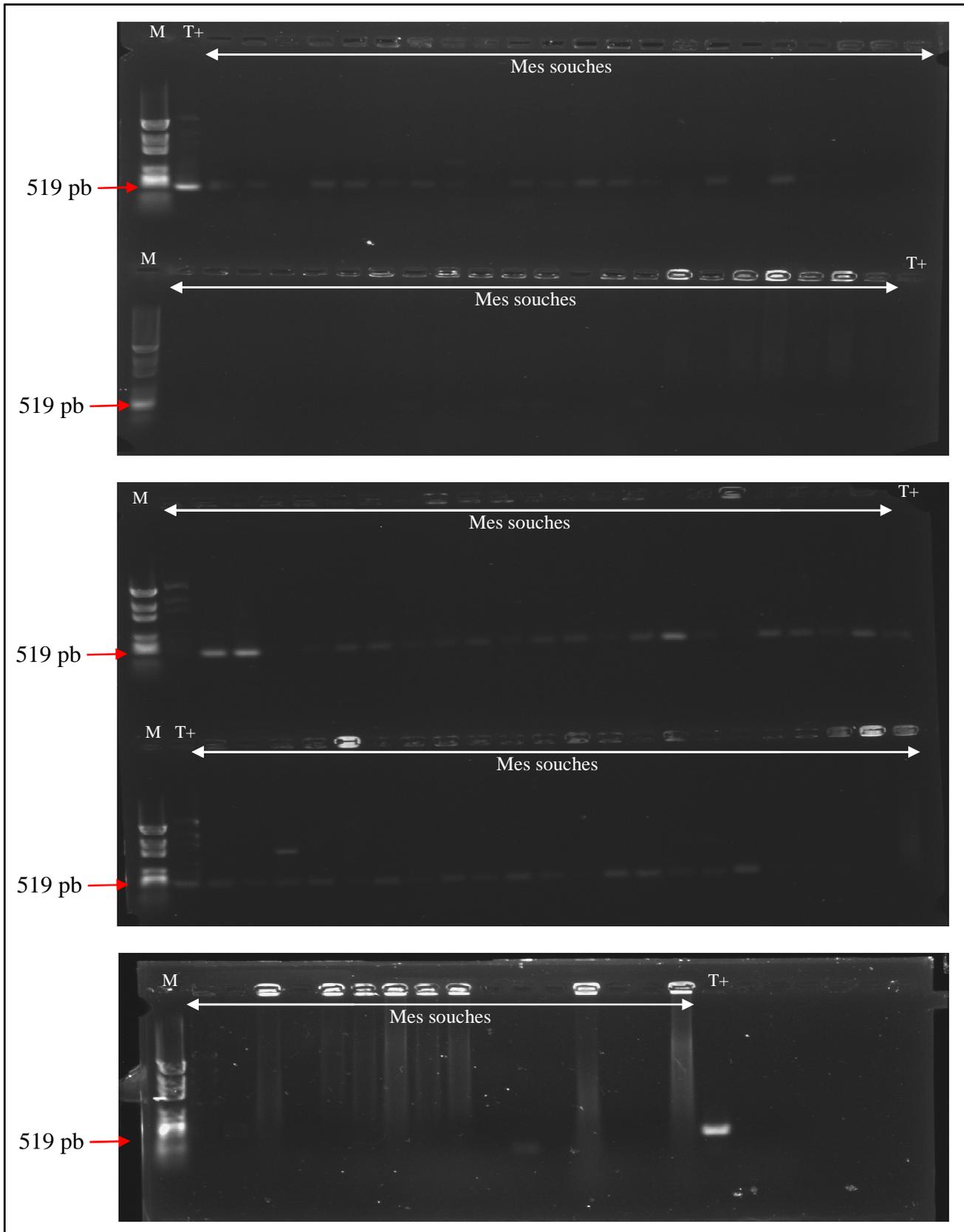


Figure 23. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{CTX}*.

M : marqueur de tailles de l'ADN, Pb : paire de bases, T+ : témoin positif.

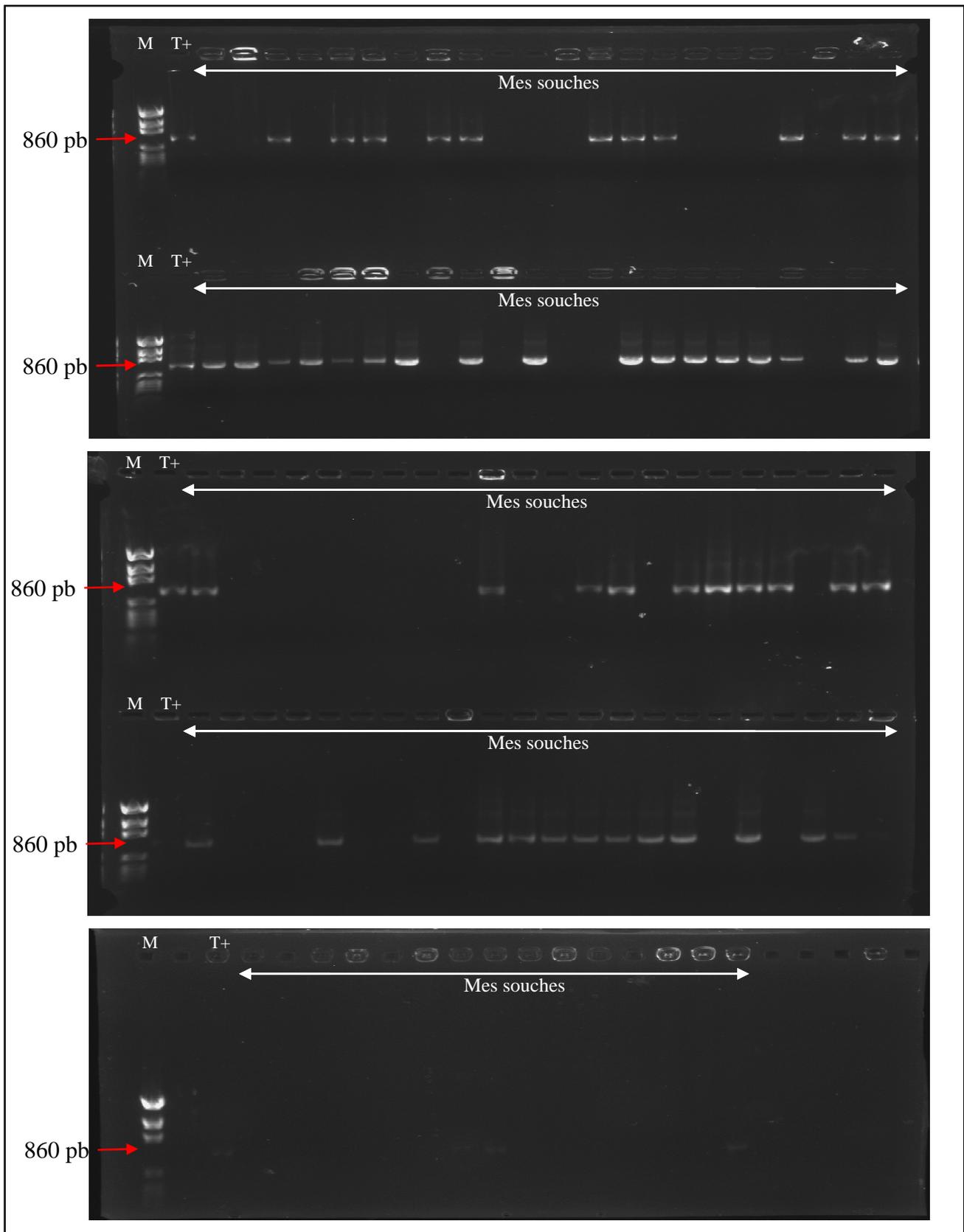


Figure 24. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{TEM}*.

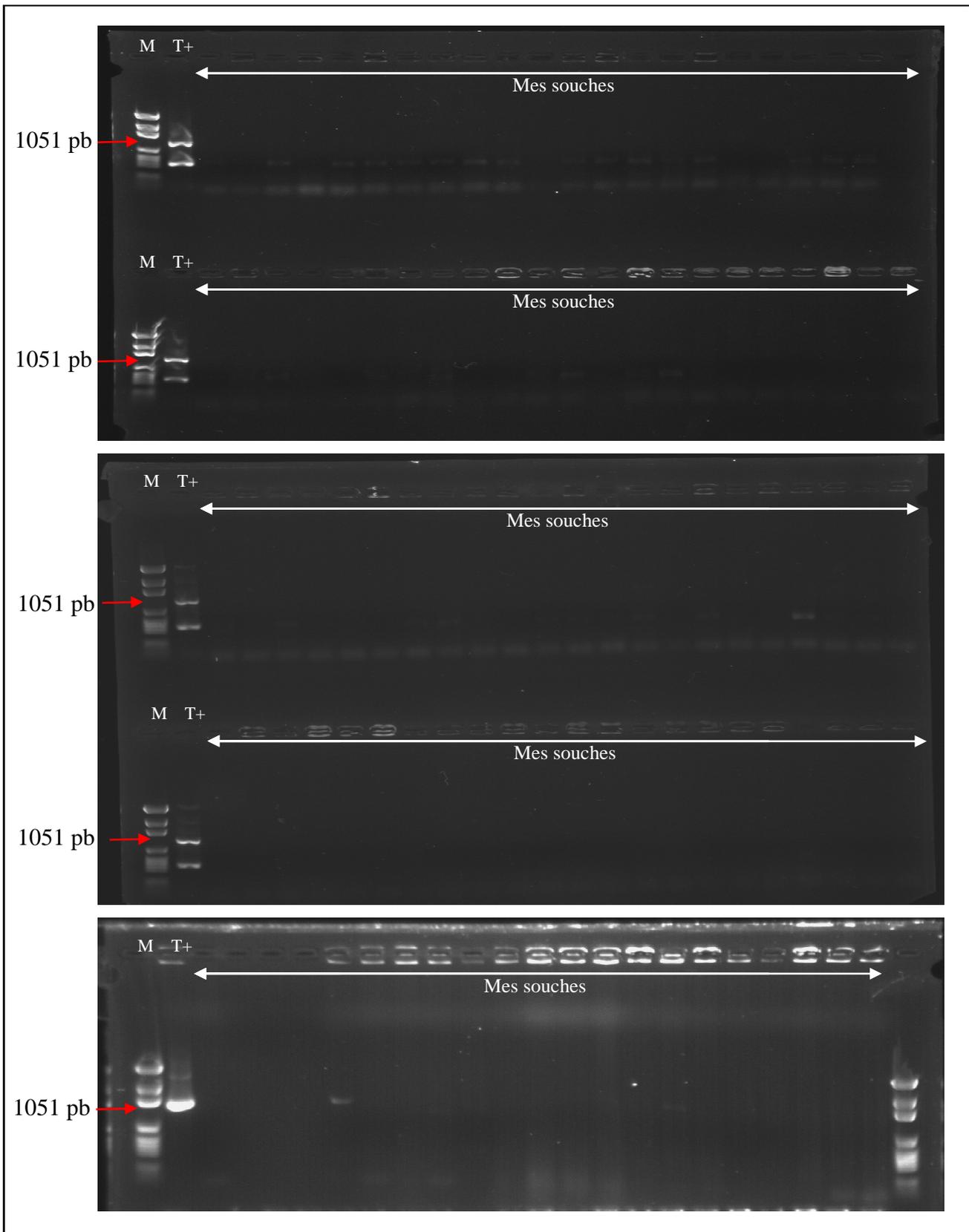


Figure 25. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{SHV}*.

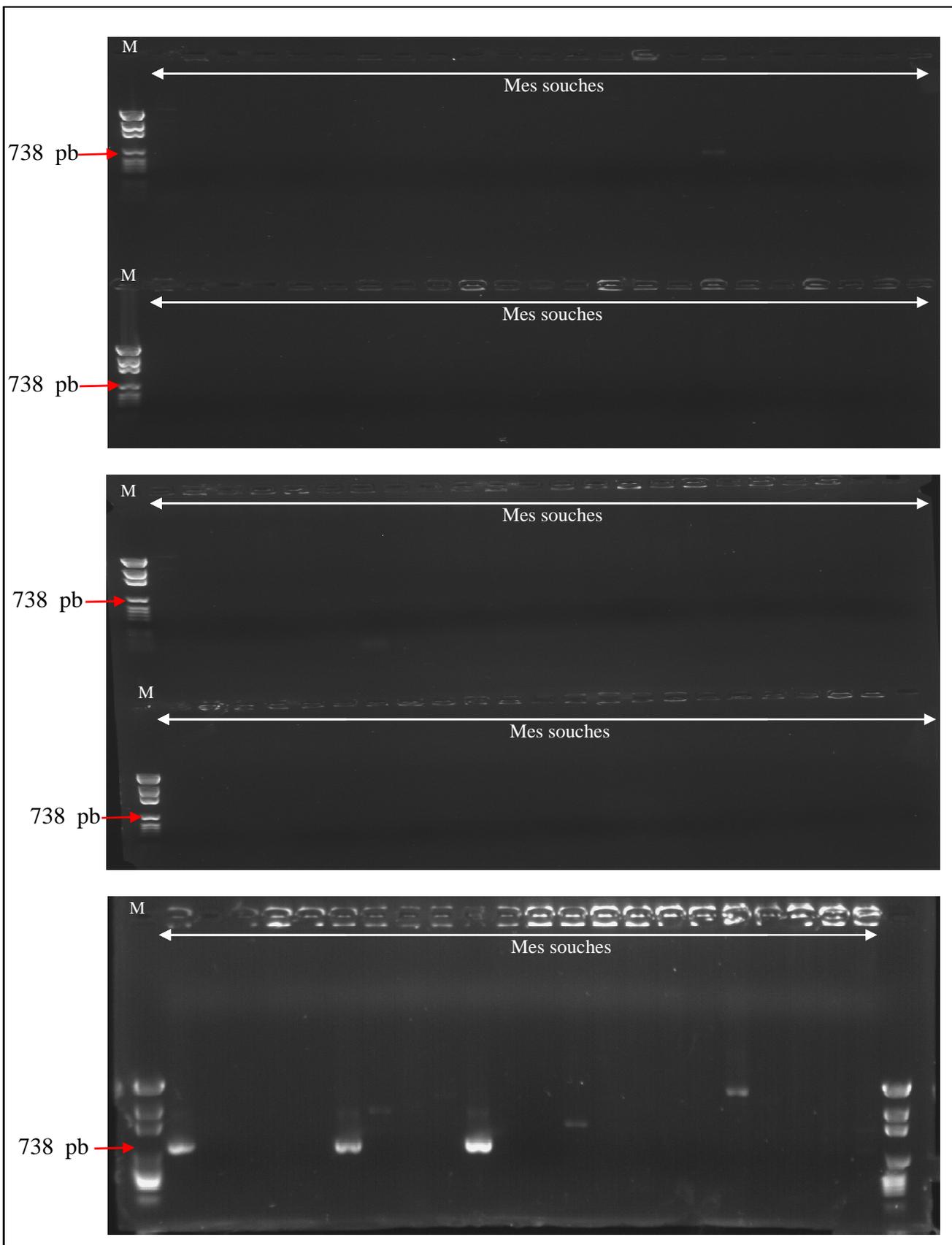


Figure 26. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{PER}*.

5.2. Recherche moléculaire des carbapénèmases

5.2.1. Par PCR en temps réel

La PCR en temps réel a révélé que sur les 4 souches de *Proteus* résistantes à l'imipénème, une souche possède le gène *bla_{OXA-24}* codant pour une carbapénémase. Aucune souche ne possède les gènes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM-1}* ni *bla_{KPC}*.

5.2.2. Par PCR Standard

Les résultats de la PCR standard des gènes codant pour des carbapénèmases ont confirmé les résultats de la PCR en temps réel. Le séquençage de l'ADN correspondant à la bande positive sur gel d'agarose montre que parmi les 4 souches résistantes à l'imipénème, une seule souche porte un gène codant pour une carbapénémase qui est le *bla_{OXA-24}* (figure 27).

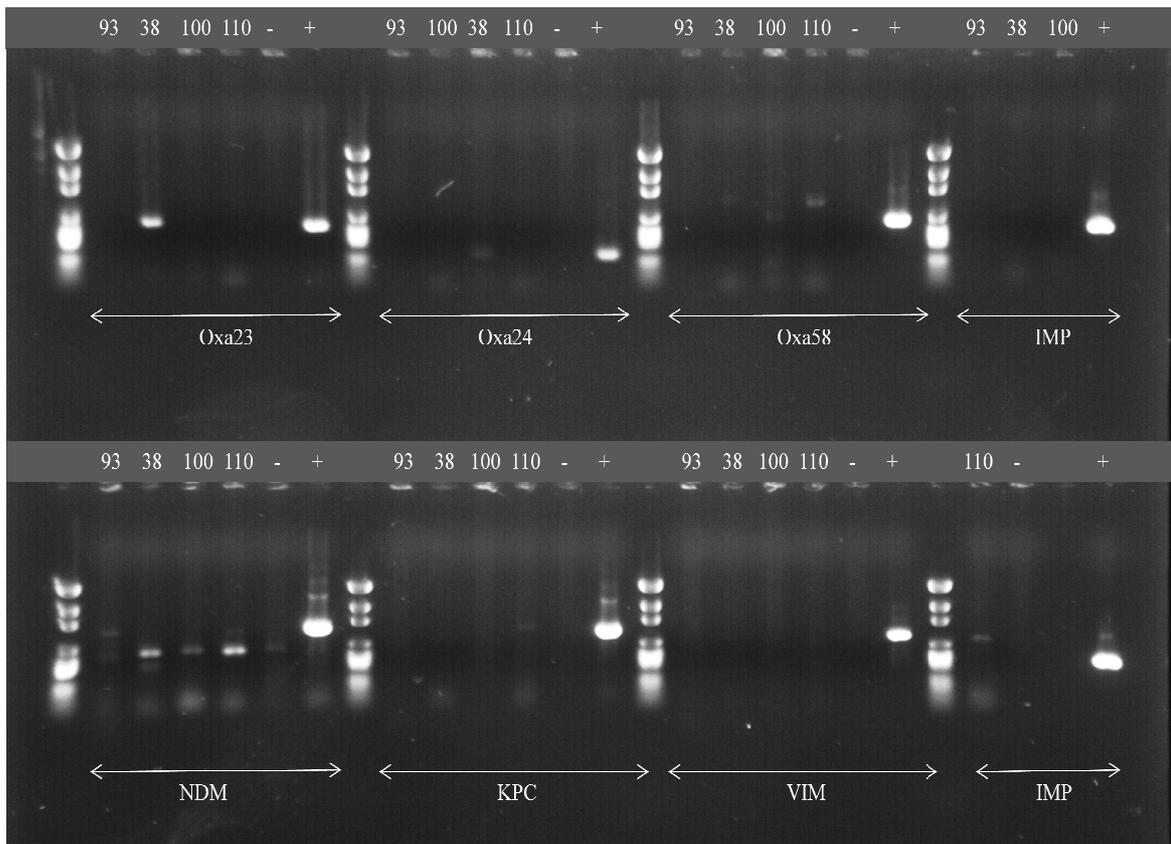


Figure 27. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes codant pour une carbapénémase.

Les carbapénèmes ont une bonne activité contre les *PMP*. Elles sont très souvent utilisées pour traiter les infections causées par les souches multi-résistantes. Malheureusement, on assiste ces dernières années à l'émergence et la propagation de la résistance aux carbapénèmes. Cette résistance est due, principalement, à la production de carbapénémases, essentiellement de classe D (oxacillines) parfois de classe B (métaallo- β -lactamases).

D'après les données de la littérature, les gènes codants pour des carbapénémases ont largement été détectés dans de nombreux groupes bactériens dans différents pays. Cependant, les rapports sur les *Proteus spp.* produisant une carbapénémase sont rares. Bonnet et *al.* sont les premiers à signaler, en 2002 en France, la présence d'une souche de *P. mirabilis* résistante aux carbapénèmes en produisant une carbapénémase de classe D de type *bla_{OXA-23}* [9]. Différentes études ont par la suite rapporté la présence de souches de *P. mirabilis* résistantes aux carbapénèmes par production d'une carbapénémase de classe B, métaallo- β -lactamase, de type *bla_{VIM-1}* [8, 355-359]. En 2008, Tibbetts et *al.* ont rapporté pour la première fois la résistance d'une seule souche de *P. mirabilis* aux carbapénèmes par production d'une carbapénémase de type *bla_{KPC}* aux Etats-Unis [360]. Récemment, Hu et *al.* ont signalé l'émergence d'une souche de *P. mirabilis* coproductrice des gènes *bla_{KPC-2}* et *qnrD* dans un hôpital chinois [361], et Cicek et *al.* ont rapporté la première identification de la cassette du gène *bla_{OXA-320-aadA1}*, un nouveau variant de la catégorie D de β -lactamase, dans une souche de *P. mirabilis* en Turquie [362]. Dans notre étude, le principal support moléculaire de la résistance aux carbapénèmes est la présence du gène *bla_{OXA-24}* codant pour une carbapénémase de classe D. Ce gène a été déjà rapporté en Algérie chez 6 souches d'*A. baumannii* isolées en 2011 dans différents hôpitaux à Tlemcen, Setif, Sidi Bel Abbas, Oran et Tizi Ouzou [17], et chez 17 autres souches d'*A. baumannii* isolées dans trois différents hôpitaux à l'Ouest de l'Algérie (Tlemcen, Oran et Sidi Bel Abbas) de 2008 à 2012 [16]. **Toutefois, l'existence d'une souche de *P. mirabilis* résistante aux carbapénèmes grâce à une carbapénémase de classe D de type *bla_{OXA-24}* n'a jamais été décrite auparavant, et constitue donc une première mondiale.** Cela peut suggérer que l'épidémiologie des gènes codant pour une carbapénémase a changé grâce au transfert horizontal de plasmides portant le gène *bla_{OXA-24}* entre les différents groupes bactériens.

En ce qui concerne les 3 autres souches de *Proteus* résistantes à l'imipénème sans production d'une carbapénémase, cette résistance pourrait être le résultat d'une modification des porines, diminuant ainsi la perméabilité de la membrane externe, associée à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE [363].

5.3. Recherche moléculaire des résistances associées (aminosides et quinolones)

5.3.1. Résistance aux aminosides

Les résultats de la PCR standard des gènes codant pour la résistance aux aminoglycosides, révèle que sur les 110 souches étudiées, 22 (20%) sont productrices d'une ou plusieurs enzymes modificatrices des aminosides (dont la même souche peut avoir plusieurs gènes à la fois) donnant ainsi 29 profils (figure 28 à 32) dont:

- 12 (54,55%) souches de *PMP* portent le gène *aac(6')-Ib*, il s'agit de 8 souches de *P. mirabilis*, 3 souches de *P. vulgaris* et 1 souche de *M. morganii*.

- 8 (36,36%) souches de *PMP* porte le gène *aadA* dont 5 souches sont des *P. mirabilis* (4 souches portent le *aadA2* et une le *aadA1*), 2 souches des *P. vulgaris* (une souche porte le *aadA2* et une le *aadA1*), 1 souche de *M. morganii* porte le *aadA2* et une souche de *P. stuartii* porte le *aadA1*.

- 4 (18,18%) souches de *PMP* portent le gène *ant(2'')-I* dont 1 souche est une *P. mirabilis*, 2 souches sont des *P. vulgaris* et 1 souche est *M. morganii*.

- 3 (13,64%) souches de *PMP* portent le gène *aac(3)-Ia* dont 2 sont des *P. mirabilis* et l'autre est une *M. morganii*.

- 2 (9,09%) souches de *PMP* portent le gène *armA* dont une est une *P. mirabilis* et l'autre est une *P. vulgaris*.

Les aminosides continuent à jouer un rôle important dans le traitement des infections sévères dues aux pathogènes à Gram négatif souvent en association avec les β -lactamines à large spectre [70]. Ces antibiotiques agissent en se liant au site aminoacyl (site A) de l'ARN16S de la petite sous-unité ribosomale 30S des procaryotes et interfèrent avec la synthèse des protéines [70]. Leur utilisation massive a contribué à la sélection et la propagation, dans le monde entier, de souches résistantes par différents mécanismes

incluant les enzymes-modifiant les aminosides (AME) [364]. Dans notre étude, nous avons mis en évidence 7 types de combinaison d'enzymes modifiant les aminosides chez *P. mirabilis*, 4 types de combinaison chez *P. vulgaris*, 2 combinaisons chez *M. morganii* et enfin une combinaison chez *P. stuartii*, formées avec 6 types de gènes codant pour des AME (tableau 29). Parmi les AME, l'AAC(6')-Ib, responsable de la résistance à l'amikacine chez des bactéries à Gram négatif, est probablement la plus importante acétyltransférase sur le plan clinique et c'est le mécanisme de résistance aux aminosides le plus fréquemment rencontré chez les entérobactéries [365].

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par de précédentes études en Algérie sur les mécanismes de résistance aux aminosides chez différentes souches cliniques à Gram négatif [16, 56, 366-370], sauf qu'aucun de ces rapports n'a étudié la résistance aux aminosides chez des souches de *PMP*.

D'après ces résultats on suggère que durant la période allant de 2007 à 2013 les gènes codant pour une AME sont devenus endémiques en Algérie et se sont propagés entre les différentes espèces de bactéries à Gram négatif.

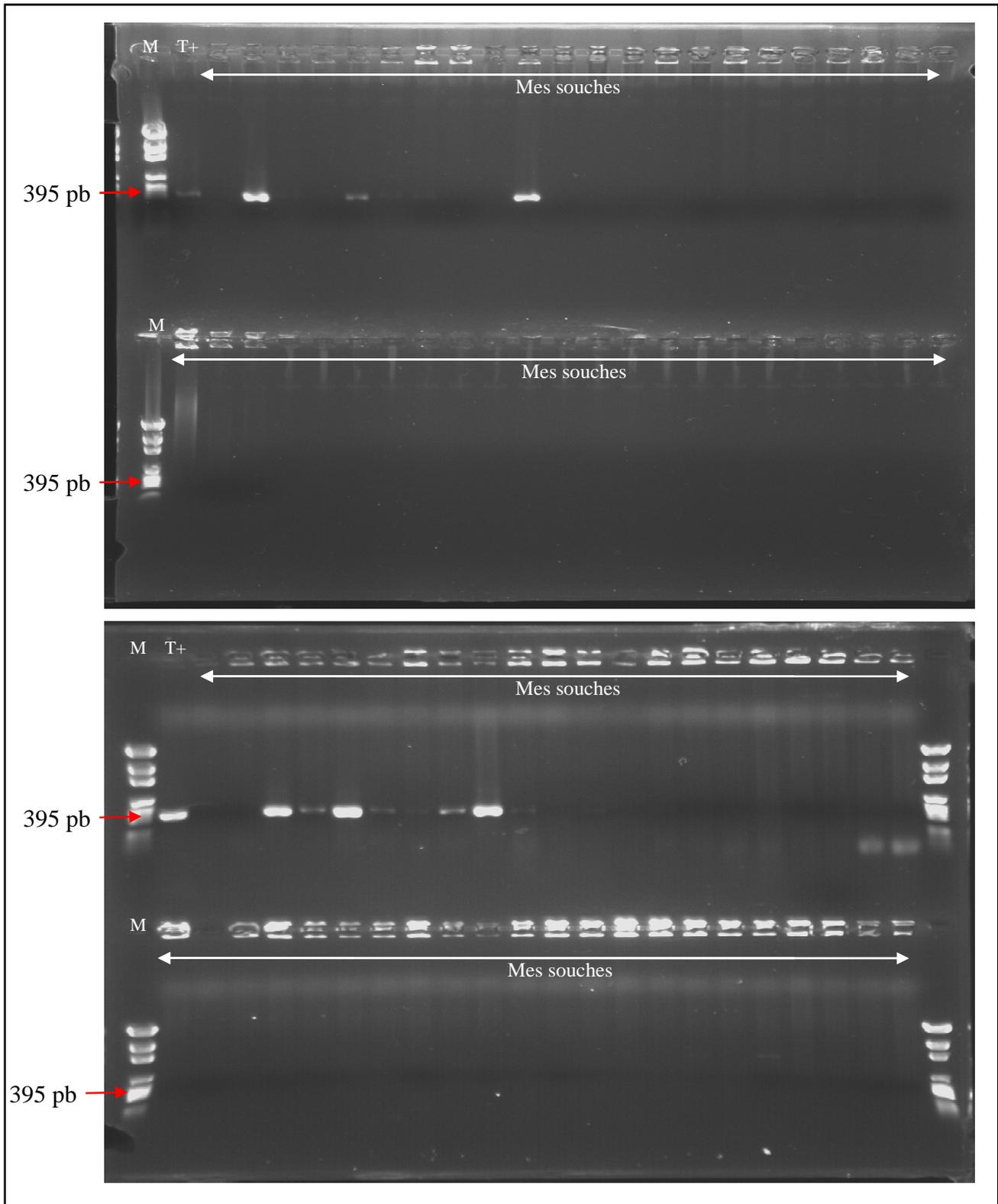


Figure 28. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aac(6')-Ib*.

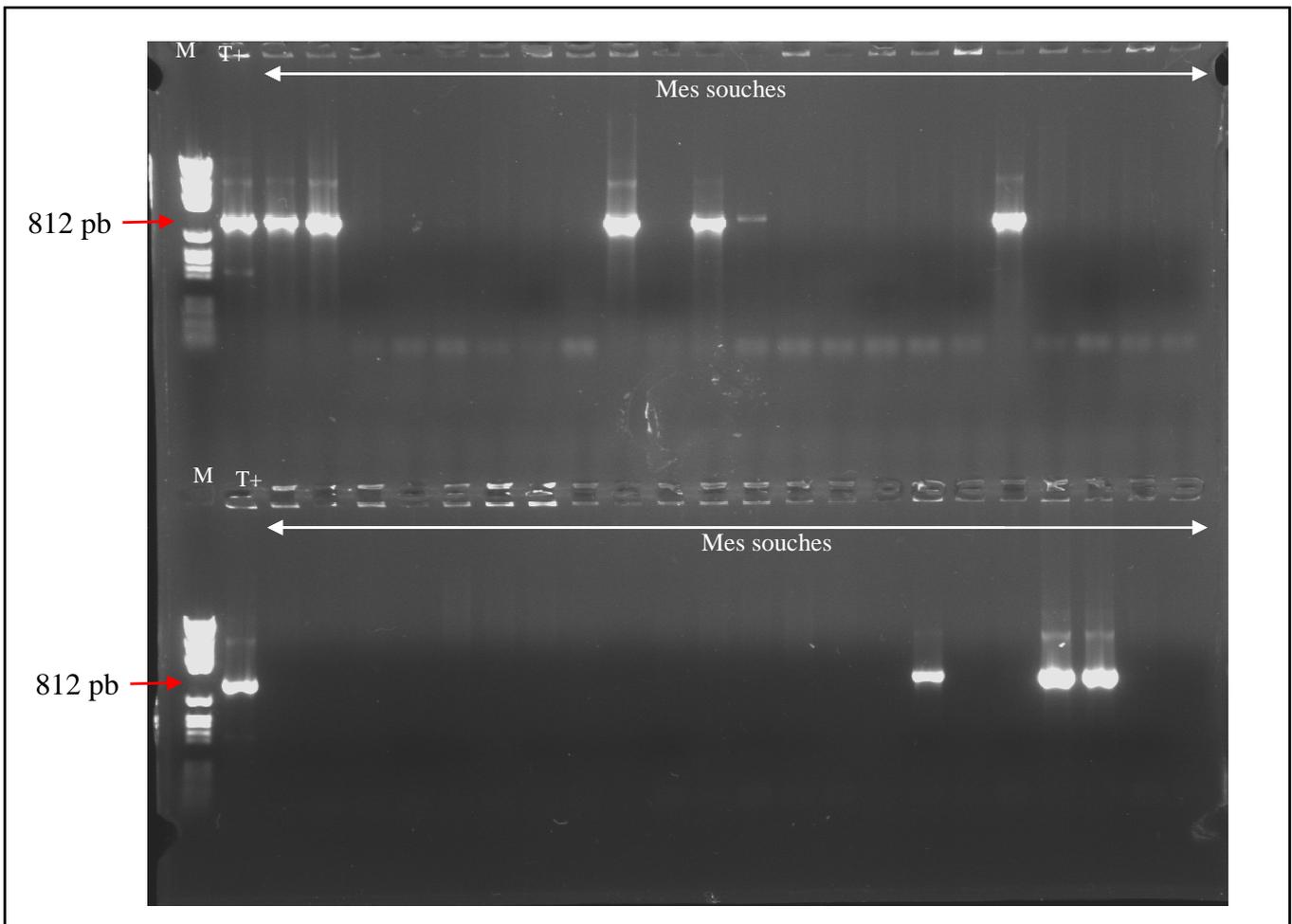


Figure 29. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aadA*

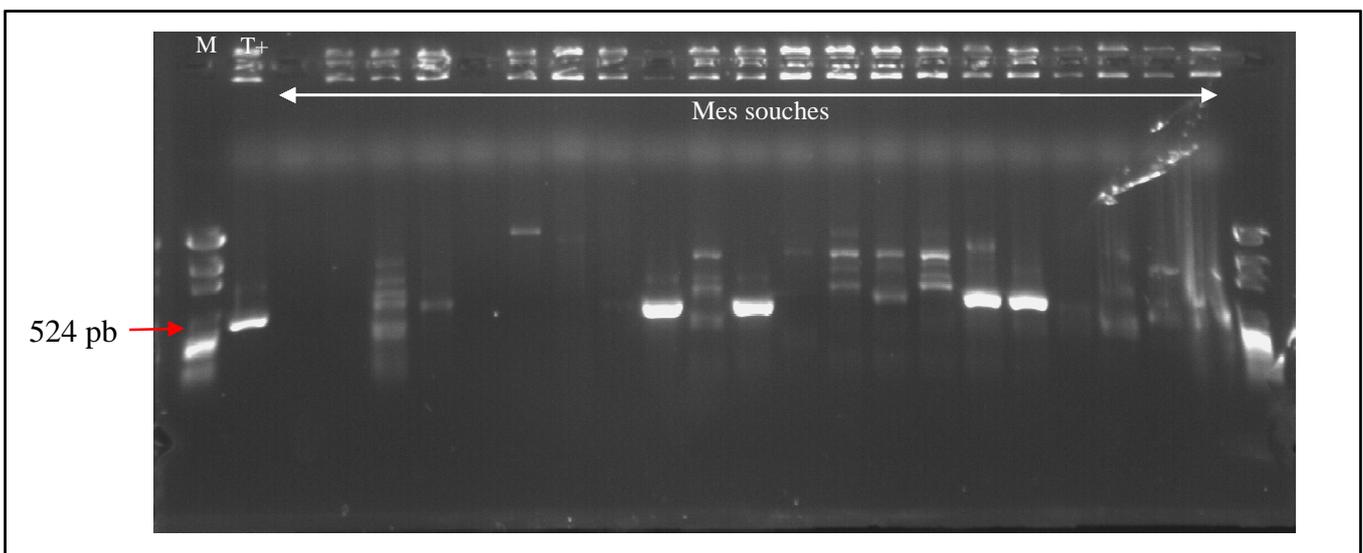


Figure 30. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *ant(2'')*

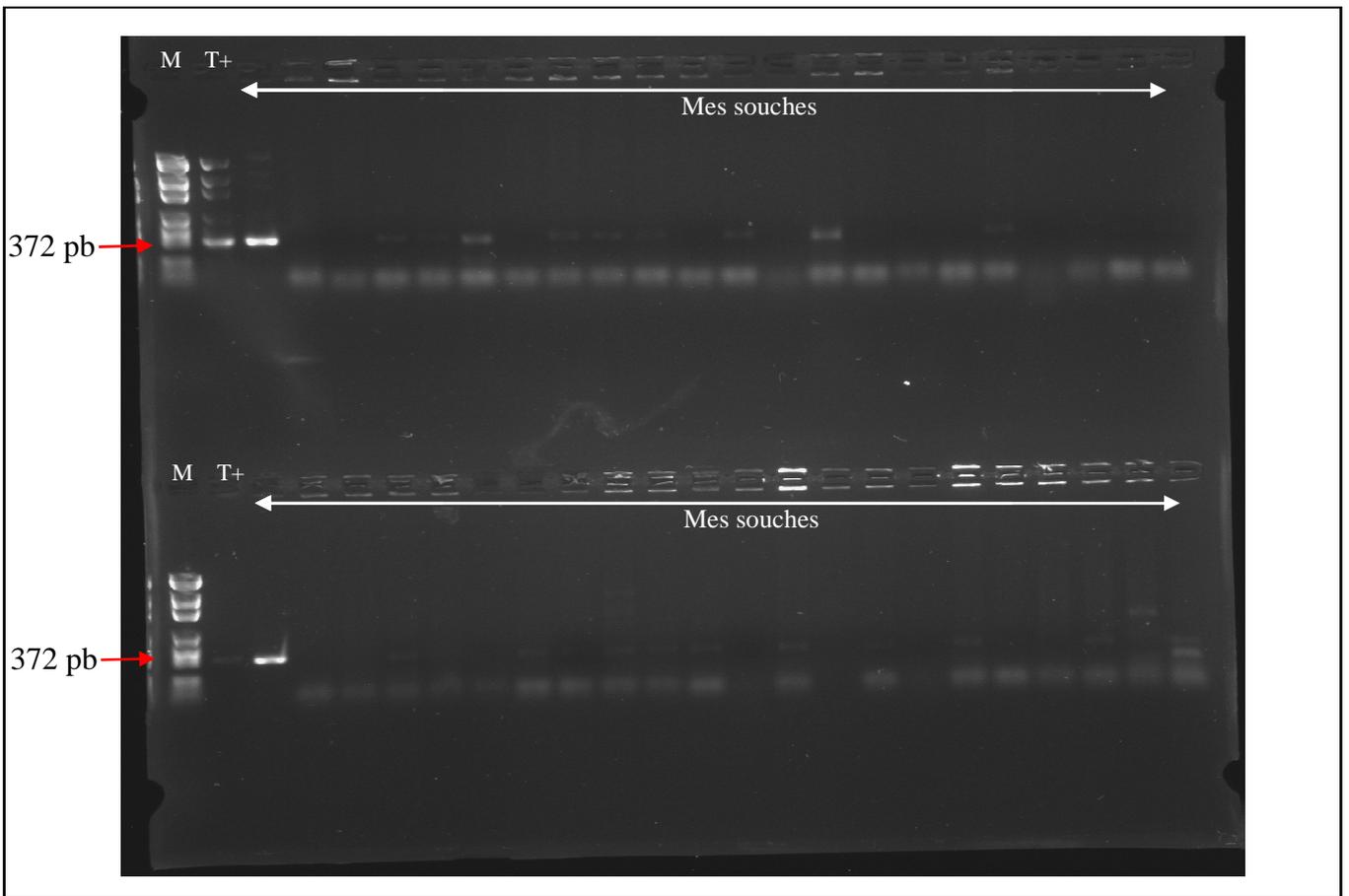


Figure 31. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aac(3)-Ia*

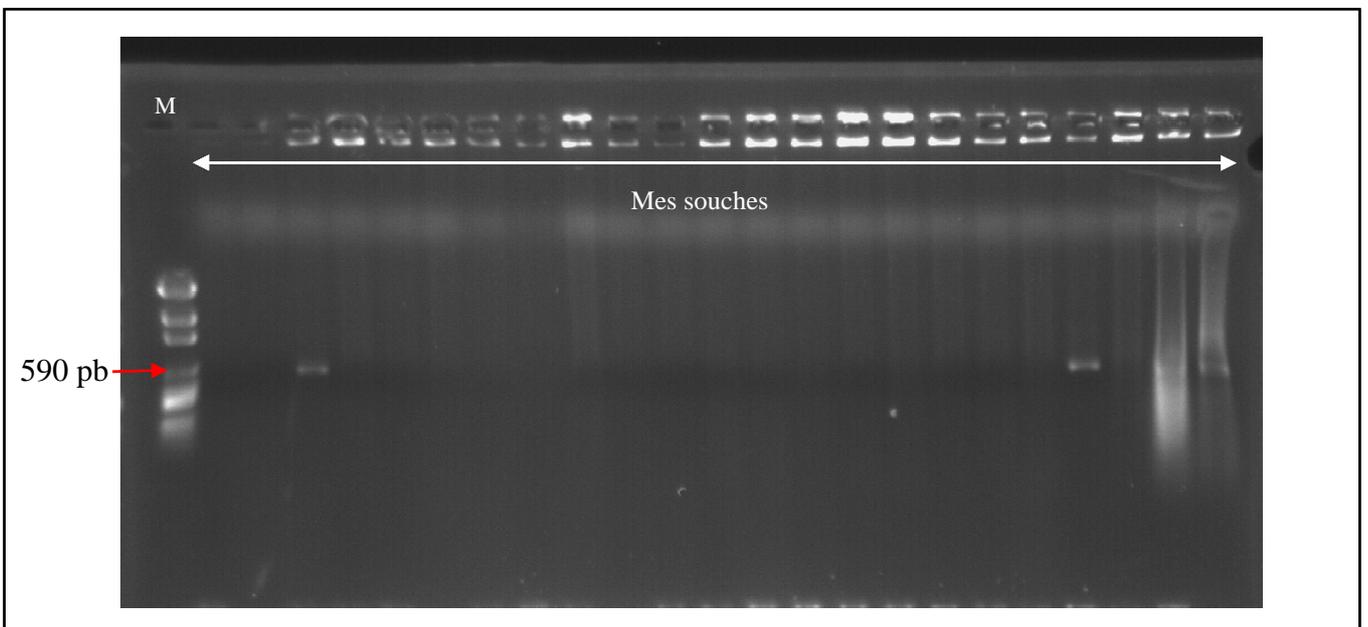


Figure 32. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *armA*

5.3.2. La résistance aux quinolones

Malgré l'existence de souches résistantes aux fluoroquinolones, aucune souche ne porte ni le gène *qnrA* ni le gène *qnrB*.

les résultats de résistance à la ciprofloxacine, observés chez nos souches, suggèrent que le principal mécanisme de résistance aux fluoroquinolones de nos souches est probablement dû à des mutations ponctuelles sur les gènes codant pour les gyrases ou les topoisomérases qui expriment de hauts niveaux de résistance [371]. Cependant, une souche de *P. mirabilis* est trouvée porteuse de gène *aac(6')-Ib-cr*. Cette variante est une acétyltransférase qui fait partie des enzymes modificatrices des aminosides (AME). Il se distingue de son progéniteur, le *aac(6')-Ib*, par le remplacement de deux acides aminés, Trp102Arg et Asp179Tyr et confère une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et à la norfloxacine en plus de la résistance aux aminosides [111].

Les gènes de résistance aux fluoroquinolones sont d'identification récente en Algérie. La première étude qui a rapporté la présence des gènes *qnr* a été publiée en 2008 chez des souches d'*E. cloacae* [372]. Par la suite, plusieurs études ont identifié différents variants de déterminants *qnr* souvent en association avec le gène *aac(6')-Ib-cr* chez des souches d'entérobactéries [16, 56, 366]. Ce déterminant a été découvert pour la première fois en 2006 chez une souche d'*E. coli qnrA* positif en Chine [111]. En Algérie, le gène *aac(6')-Ib-cr* a été détecté pour la première fois en 2009 chez une souche d'*E. cloacae* [366]. Depuis, deux autres études ont rapporté la présence de ce gène aussi bien en milieu hospitalier que communautaire [16, 373]. Mais ce gène n'a pas encore été rapporté en Algérie chez des souches appartenant au groupe *PMP*, bien qu'il soit récemment signalé en Afrique du Nord chez des souches cliniques de *P. mirabilis* et *M. morgani* isolées en Tunisie [374] ce qui suggère qu'il y a une propagation de ce gène entre groupes bactériens et une dissémination clonale au sein de souches de *PMP* en Afrique du Nord.

L'émergence de nouveaux mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones constitue une vraie menace concernant l'efficacité des fluoroquinolones, et ce, à plusieurs niveaux. D'abord, leur présence sur des plasmides conjugatifs favorise leur mobilité et leur dissémination chez les différents pathogènes. En plus, leur association à d'autres déterminants de résistance, essentiellement les bêta-lactamines et aminosides, concourt à

une cosélection de la résistance aux fluoroquinolones par ces derniers antibiotiques largement utilisés en thérapeutique humaine.

Ce mécanisme plasmidique de résistance aux quinolones confère un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones, mais leur présence pourrait en outre favoriser l'évolution vers un plus haut niveau de résistance par la sélection de mutation dans les cibles de ces molécules [366]. L'émergence de ces gènes de résistance en Algérie pourrait poser un problème de santé publique et impose de mettre en place une politique pertinente de surveillance de la résistance en vue d'un meilleur contrôle de la circulation des souches multirésistantes.

Tableau 33. Profils génotypiques de résistance aux antimicrobiens des 110 isolats de *PMP*

Espèces	Groupes	Gène	Nb	%	Mécanisme de résistance
<i>P. mirabilis</i>	1	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	6	5.45	BLSE
	2	<i>bla_{CTX-M-15} + bla_{TEM-1}</i>	3	2.73	BLSE
	3	<i>bla_{CTX-M-15} + bla_{TEM-2}</i>	1	0.91	BLSE
	4	<i>bla_{TEM-1}</i>	29	26.36	BLSE
	5	<i>bla_{TEM-1} + aadA2</i>	3	2.73	BLSE + AME
	6	<i>bla_{TEM-1} + bla_{OXA-24} + aadA2 + armA</i>	1	0.91	BLSE + Carbapénèmase + AME
	7	<i>bla_{TEM-1} + aadA1 + aac(3)-Ia</i>	1	0.91	BLSE + AME
	8	<i>bla_{TEM-1} + aac(6')-Ib</i>	1	0.91	BLSE + AME
	9	<i>bla_{TEM-2}</i>	9	8.18	BLSE
	10	<i>bla_{TEM-2} + aac(6')-Ib-cr</i>	1	0.91	BLSE + AME + Résistance aux fluoroquinolones
	11	<i>aac(6')-Ib</i>	6	5.45	AME
	12	<i>aac(6')-Ib + ant(2'')-I</i>	1	0.91	AME
	13	<i>aac(3)-Ia</i>	1	0.91	AME
<i>P. vulgaris</i>	1	<i>bla_{TEM-1}</i>	1	0.91	BLSE
	2	<i>bla_{TEM-2} + bla_{PER-1} + bla_{SHV-11} + aadA1 + aac(6')-Ib + ant(2'')-I</i>	1	0.91	BLSE + AME
	3	<i>bla_{TEM-2} + bla_{PER-1} + aadA1 + aac(6')-Ib + ant(2'')-I</i>	1	0.91	BLSE + AME
	4	<i>bla_{PER-1} + aac(6')-Ib</i>	1	0.91	BLSE + AME
	5	<i>armA, aadA2</i>	1	0.91	AME
<i>M. morgani</i>	1	<i>bla_{TEM-1}</i>	1	0.91	BLSE
	2	<i>aac(6')-Ib</i>	1	0.91	AME
	3	<i>aac(3)-Ia + aadA2 + ant(2'')-I</i>	1	0.91	AME
<i>P. stuartii</i>	1	<i>aadA1</i>	1	0.91	AME
Total			72	65,45	

Nb : nombre de souches

Tableau 34: Caractéristique phénotypiques et génotypiques des 110 souches de *PMP* isolées

n	Nature de pvt	SEX	Service	Souche	Profil génotypique		
					BLSE	Carbapénèmases	AME
1.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15	-	-
2.	Pus	F	Endocrinologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
3.	Pus	H	Neurologie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
4.	Pus	H	Epidémiologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
5.	Pus	F	Endocrinologie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	aac(3)-Ia ; aadA1
6.	Ponction d'ascite	F	Maladies infectieuses	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
7.	Pus	H	Orthopédie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
8.	Liquide péritonéal	H	Orthopédie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
9.	Pus	F	Cardiologie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
10.	Liquide pleural	H	Chirurgie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-
11.	Pus	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
12.	Pus	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15	-	-
13.	Pus	H	Endocrinologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	aac(3)-Ia
14.	Pus	H	Externe	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
15.	Pus	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
16.	Sonde	F	Cardiologie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-
17.	Pus	H	Pneumo	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
18.	Pus	H	Orthopédie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
19.	Pus	F	Gynécologie	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15	-	-
20.	Sonde	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
21.	Pus	F	Réa centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
22.	Pus	H	Dermatologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
23.	Pus	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
24.	Pus	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
25.	Pus	F	Maladies infectieuses	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
26.	Pus	H	ORL	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-

Tableau 34: Caractéristique phénotypiques et génotypiques des 110 souches de *PMP* isolées (suite)

27.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
28.	Pus	F	ORL	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-
29.	Pus	F	Maladies infectieuses	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
30.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
31.	Pus	H	Orthopédie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
32.	Pus	F	Psychiatrie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
33.	Pus	F	Maternité	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
34.	Pus	H	Réa centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
35.	Pus	F	ORL	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-
36.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
37.	Pus	F	Gynécologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
38.	Pus	H	Chirurgie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	OXA-24	armA ; aadA2
39.	Pus	H	Chirurgie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
40.	Pus	H	ORL	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
41.	Pus	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
42.	Pus	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
43.	Cathéter	F	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
44.	Pus	F	Maladies infectieuses	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
45.	Pus	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	aadA2
46.	Pus	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	aadA2
47.	Pus	H	Orthopédie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
48.	Pus	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15	-	-
49.	Pus	F	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15	-	-
50.	Pus	H	Orthopédie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
51.	Pus	F	Maladies infectieuses	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
52.	Urine	H	Externe	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
53.	Urine	H	Pédiatrie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
54.	Urine	F	Endocrinologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
55.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
56.	Urine	F	Maladies infectieuses	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-

Tableau 34: Caractéristique phénotypiques et génotypiques des 110 souches de *PMP* isolées (suite)

57.	Urine	H	Externe	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
58.	Urine	F	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
59.	Urine	H	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
60.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
61.	Urine	F	Gastro-enchologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
62.	Urine	F	Pédiatrie	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15 ; TEM - 1	-	-
63.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15 ; TEM - 2	-	-
64.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
65.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
66.	Urine	F	Chirurgie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
67.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-
68.	Urine	F	Externe	<i>P. vulgaris</i>	TEM - 1	-	-
69.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
70.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
71.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
72.	Urine	F	Parasitologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
73.	Urine	F	Chirurgie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
74.	Urine	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
75.	Urine	F	Neurologie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
76.	Urine	H	Externe	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15	-	-
77.	Urine	F	Médecine légale	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
78.	Urine	F	Réa-Chirurgicale	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
79.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-
80.	Urine	H	Maladies infectieuses	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
81.	Urine	H	Psychiatrie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	-
82.	Urine	H	Centre des brûlés	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	-
83.	Urine	F	Neurologie	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15 ; TEM - 1	-	-
84.	Urine	F	Orthopédie	<i>P.mirabilis</i>	CTX-M-15 ; TEM - 1	-	-
85.	Urine	H	Externe	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	aac(6')-Ib-cr
86.	Urine	F	Externe	<i>P.mirabilis</i>	-	-	aac (6') – Ib ; ant (2")

Tableau 34: Caractéristique phénotypiques et génotypiques des 110 souches de *PMP* isolées (suite)

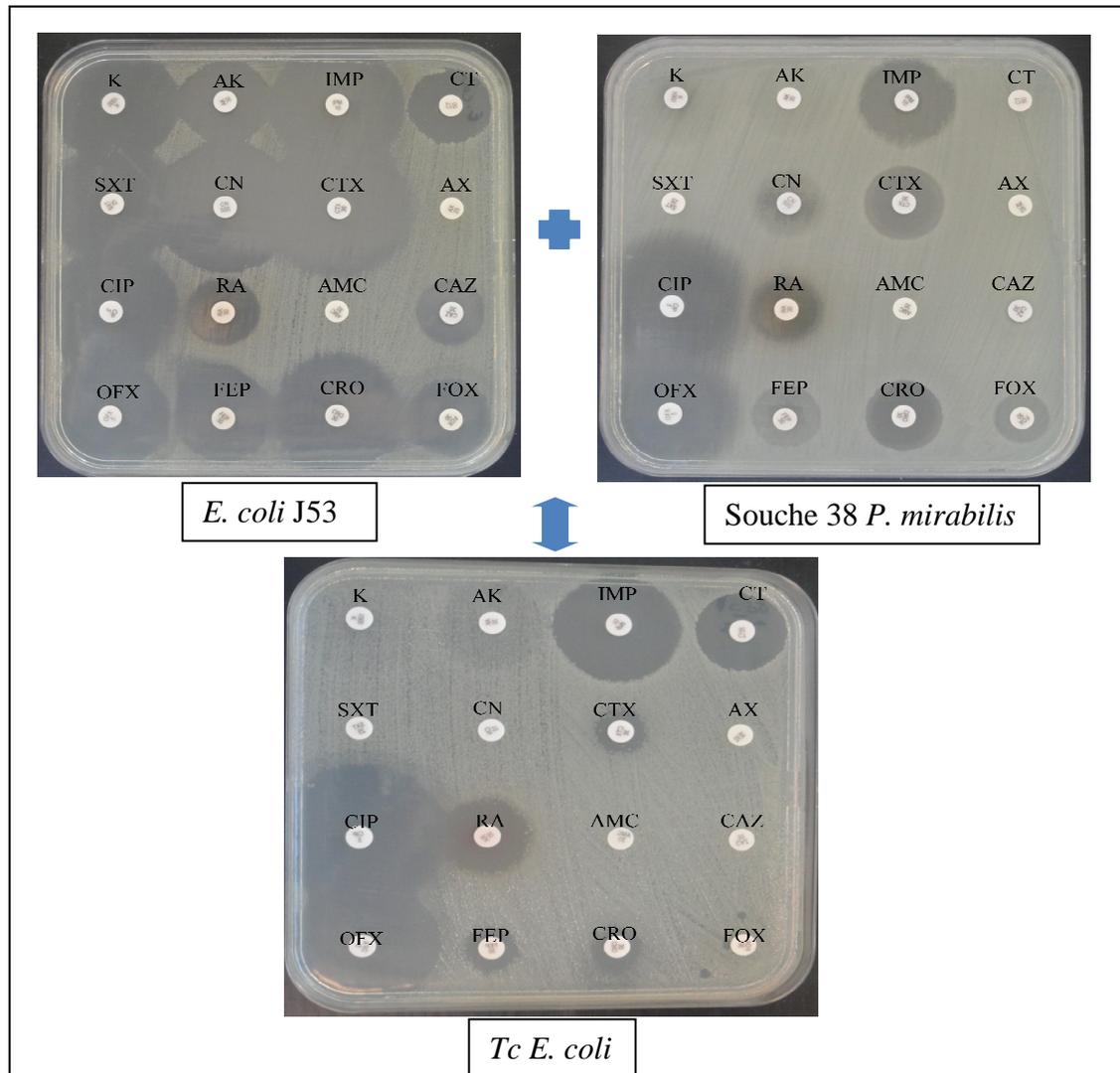
87.	Urine	F	Psychiatrie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 2	-	aac (6') - Ib
88.	HMC	F	Réanimation	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
89.	Sonde	H	Réanimation	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	aac (6') - Ib ; aadA2
90.	Urine	F	Réanimation	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	aac (6') - Ib
91.	Sonde	H	Réanimation	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	aac (6') - Ib
92.	Pus	H	Endocrinologie	<i>P. vulgaris</i>	-	-	-
93.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
				<i>P.vulgaris</i>	SHV-11 ; TEM - 2 ; PER - 1	-	aac (6') - Ib ; ant (2") ; aadA1
94.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.vulgaris</i>	-	-	-
95.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.vulgaris</i>	-	-	-
96.	Pus	H	Endocrinologie	<i>P.vulgaris</i>	-	-	-
97.	Pus	H	Médecine interne	<i>P. vulgaris</i>	PER-1	-	aac (6') - Ib
98.	Pus	H	Médecine interne	<i>Pr.Stuartii</i>	-	-	aadA1
99.	Pus	F	Gynécologie	<i>M.morganii</i>	-	-	-
100.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
				<i>P.vulgaris</i>	TEM - 2 ; PER - 1	-	aac (6') - Ib ; ant (2") ; aadA1
101.	Pus	H	Endocrinologie	<i>P.mirabilis</i>	TEM - 1	-	aac (6') - Ib
102.	Pus	H	Orthopédie	<i>M.morganii</i>	-	-	ant (2") ; aac(3)-I ; aadA2
103.	Pus	H	Orthopédie	<i>M.morganii</i>	-	-	aac (6') - Ib
104.	Pus	H	Chirurgie	<i>P.mirabilis</i>	-	-	-
105.	Pus	H	Médecine interne	<i>P.mirabilis</i>	-	-	aac (6') - Ib
106.	Pus	F	Chirurgie	<i>M.morganii</i>	-	-	-
107.	Urine	F	Externe	<i>M.morganii</i>	-	-	-
108.	Sonde	F	Réanimation	<i>M.morganii</i>	TEM - 1	-	aadA2
110	Urine	H	Externe	<i>P.vulgaris</i>	-	-	armA ; aadA2

M : Masculin, F : Féminin, pvt : prélèvement, ORL : Oto-Rhino-Laryngologie, Réa : Réanimation

6. Transfert de la résistance par conjugaison

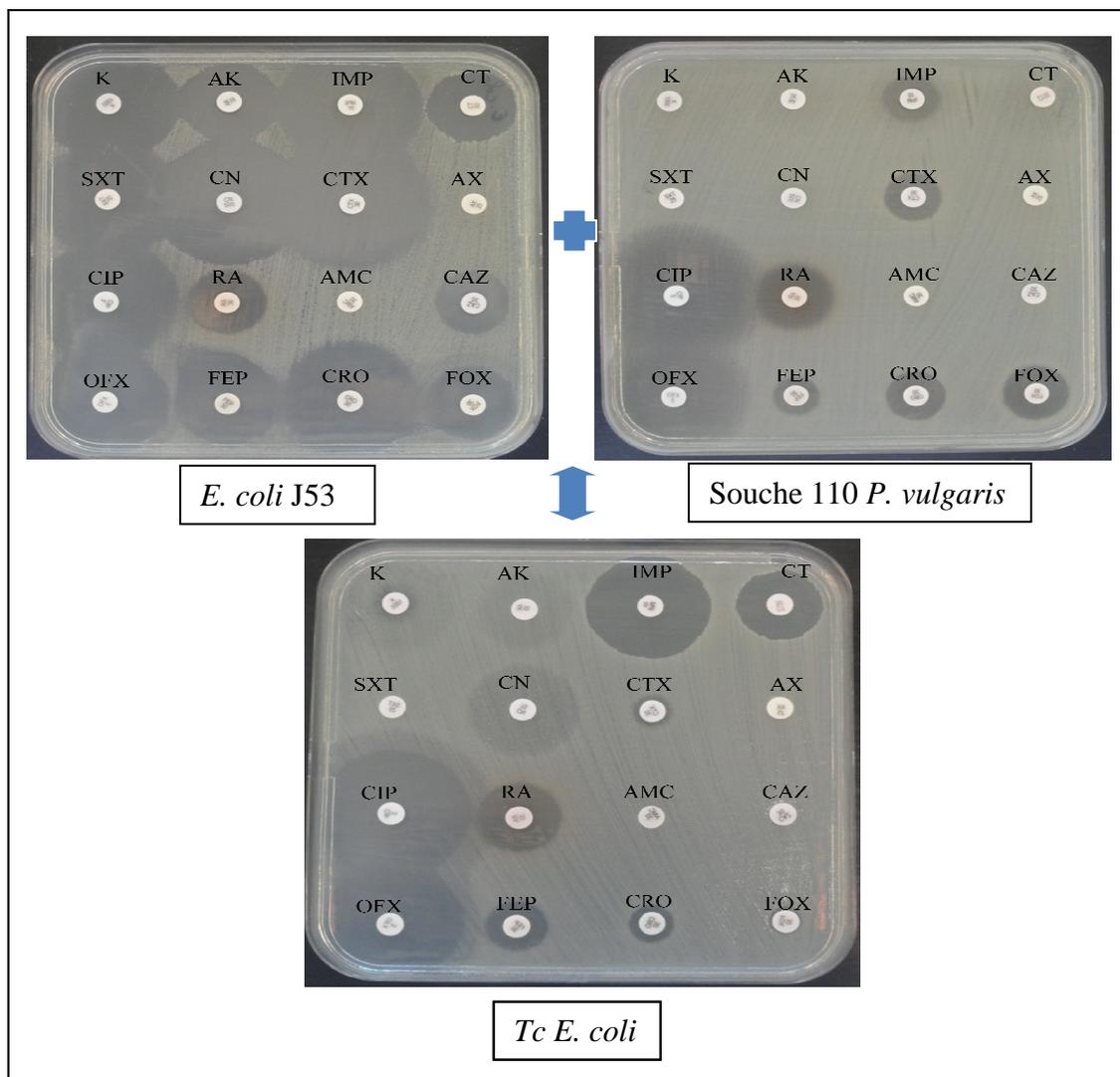
Afin de déterminer le support génétique de la résistance aux antibiotiques, un test de conjugaison a été réalisé pour les 4 souches résistantes à l'imipénème pour déterminer s'il s'agit d'une résistance chromosomique ou bien plasmidique. Ce test a été concluant pour deux souches seulement un *P. mirabilis* (la souche 38, figure 33) et un *P. vulgaris* (la souche 110, figure 34) ce qui nous a permis d'obtenir 2 transconjugants (Tc), en transférant la résistance aux β -lactamines et aux aminosides mais pas à l'imipénème. Après PCR et séquençage des gènes de résistance, nous avons constaté que les bactéries transconjugantes portent les mêmes gènes que les bactéries donatrices (tableau 35) sauf pour les gènes codants pour une carbapénèmase.

L'expérience de conjugaison révèle l'association de gènes codant pour la résistance aux β -lactamines (*bla_{TEM-1}*) et aux aminosides (*aadA-2* et *armA*) sur une même structure génétique, car on les a retrouvés dans les transconjugants après transfert d'un seul plasmide. Alors que la résistance de *P. mirabilis* à l'imipénème, codée par une carbapénèmase de classe D (*bla_{OXA-24}*) serait due à des gènes chromosomiques plutôt qu'à des facteurs de médiation plasmidique.



ATB	<i>P. mirabilis</i> (souche 38) (Donneur)	<i>E. coli</i> J53 (Récepteur)	TC
AMX	R	R	R
AMC	R	R	R
IMP	R	S	S
CTX	R	S	R
CAZ	R	S	R
FOX	R	S	R
CRO	R	S	R
FEP	R	S	R
K	R	S	R
AK	R	S	R
CN	R	S	R
CT	R	S	S
RA	S	S	S
SXT	R	S	R
OFX	S	S	S
CIP	S	S	S

Figure 33. Test de conjugaison pour la souche 38 résistante à l'imipenème



ATB	<i>P. mirabilis</i> (souche 110) (Donneur)	<i>E. coli</i> J53 (Récepteur)	TC
AMX	R	R	R
AMC	R	R	R
IMP	R	S	S
CTX	R	S	R
CAZ	R	S	R
FOX	R	S	R
CRO	R	S	R
FEP	R	S	R
K	R	S	R
AK	R	S	R
CN	R	S	R
CT	R	S	S
RA	S	S	S
SXT	R	S	R
OFX	S	S	S
CIP	S	S	S

Figure 34. Test de conjugaison pour la souche 110 résistante à l'imipénème

Tableau 35. Marqueurs et gènes de résistance des souches donatrices et de leurs transconjugants

Souches	Antibio-résistance	Gènes de résistance
Souche 38	AMX-AMC-IMP-CTX-CAZ-FOX-CRO-FEP-K-AK-CN-CT-SXT	<i>bla_{TEM-1}, armA, aadA2, bla_{OXA-24}</i>
Tc souche 38	AMX-AMC-CTX-CAZ-FOX-CRO-FEP-K-AK-CN-SXT	<i>bla_{TEM-1}, armA, aadA2</i>
Souche 110	AMX-AMC-IMP-CTX-CAZ-FOX-CRO-FEP-K-AK-CN-CT-SXT	<i>armA, aadA2</i>
Tc souche 110	AMX-AMC-CTX-CAZ-FOX-CRO-FEP-K-AK-CN-SXT	<i>armA, aadA2</i>
E. coli J 53	AMX-AMC	-

AMX: amoxicilline; AMC : amoxicilline/acide clavulanique; IMP : imipenème; CTX : céfotaxime; CAZ : céftazidime; FOX : céfoxitine ; CRO : céftriaxone; FEP : cefépime ; K : kanamicine; AK : amikacine; CN : gentamicine; SXT : triméthoprime/sulfaméthoxazole; CT : colistine; Tc : transconjugants.

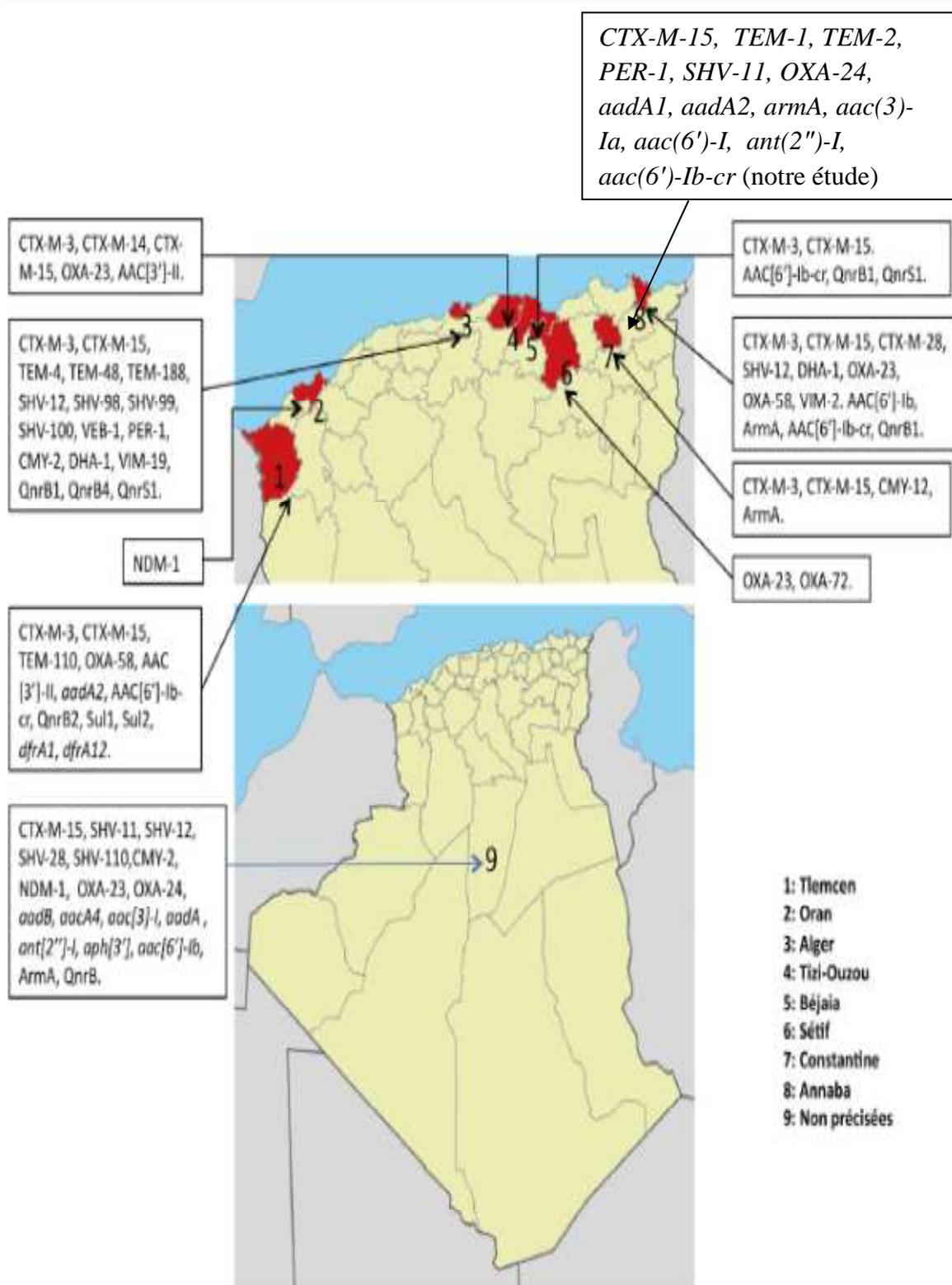


Figure 35. Répartition des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques sur le territoire algérien et plus particulièrement en Algérie septentrionale [56].

*CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES*

Les genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* contiennent un certain nombre d'agents pathogènes humains importants qui causent souvent des infections graves chez les patients hospitalisés et les personnes immunodéprimées. Différentes méthodes d'isolement et d'identification ont été développées pour la plupart des espèces de *PMP*, cependant, le traitement des patients infectés est souvent problématique en raison du développement de la résistance aux antibiotiques et de l'état immunodéprimé du patient.

Au terme de ce travail, il en ressort que la prescription d'antibiotiques ainsi l'émergence de la bactériorésistance est un problème essentiel de santé publique en Algérie comme à travers le monde. Nous avons également constaté que l'efficacité des antibiotiques décroît au fil du temps. Les bactéries cumulent les résistances à diverses familles d'antibiotiques et deviennent ainsi des multirésistantes. Cette évolution conduit à des impasses thérapeutiques. En effet, ces dix dernières années, une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques a été constatée chez les bacilles à Gram négatif, en particulier chez les *PMP*.

La compréhension de cette situation nous a conduit à centrer nos recherches sur ce groupe de bactéries. Nous avons donc mené une étude épidémiologique basée sur les infections hospitalières et communautaires causées par ces germes au CHU de Constantine. La fréquence d'isolement des souches appartenant à ce groupe correspond à 7,28% de l'ensemble des prélèvements positifs. Les isolats de *PMP* ont été obtenus à partir de 14 échantillons différents, avec une prédominance dans les suppurations (47,04%) suivie par les infections urinaires (31,91%). *P. mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolées à partir de tous les échantillons, avec une fréquence de 70,06%, suivie par *P. vulgaris* (15,13%), *M. morganii* (10,19%) et *P. stuartii* (4,60%). La répartition des souches selon leur provenance montre que les souches isolées dans les infections hospitalières (78,95%) sont majoritaire par rapport à celles des infections communautaires (21,05%).

Même si les *PMP* n'occupent pas une place prépondérante dans les étiologies bactériennes d'infections communautaires ou bien acquises à l'hôpital, le niveau de leurs résistances aux antibiotiques et surtout l'évolution de ces résistances est essentiel à connaître et à surveiller. Leurs places importantes dans la colonisation digestive et leurs rôles de réservoir potentiel de plasmides porteurs de gènes codant pour des mécanismes de résistance, en font un marqueur épidémiologique non négligeable.

Afin de bien comprendre et de mettre en évidence la dissémination et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des souches de *PMP* isolées qui ont montré un profil de multi-résistance, des études d'épidémiologie moléculaire ont été réalisées. Ces études ont révélé une diversité génétique des gènes qui codent pour les BLSE avec l'émergence de nouveaux gènes au niveau du CHU de Constantine. De plus, cette étude confirme la propagation et la dissémination internationale des gènes *bla_{TEM}* (88,33%), *bla_{CTX-15}* (16,67%), en plus de la présence d'autres marqueurs de résistance, tels les gènes *bla_{PER-1}* (5%) et *bla_{SHV-11}* (1,67%) (**Détecté pour la première fois chez une souche de *Proteus***).

Les carbapénèmes restent les molécules de premier choix pour le traitement des infections par les bactéries productrices de BLSE, surtout dans le contexte actuel de diffusion massive des BLSE de type *bla_{CTX-M}*, mais sont des antibiotiques qu'il est nécessaire de préserver. Ce d'autant qu'il n'existe actuellement pas de perspective proche de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques.

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes a augmenté dans le monde entier chez toutes les espèces des bacilles à Gram négatif cliniquement importantes et constitue un véritable défi en cela qu'elle conduit à des impasses thérapeutiques et par conséquent, compliquer la prise en charge des patients. **Dans ce travail nous avons pu mettre en évidence pour la première fois la présence d'une souche de *P. mirabilis* résistante à l'imipénème en produisant une carbapénémase de classe D de type *bla_{OXA-24}* qui n'a jamais été décrite auparavant, et constitue donc une première mondiale chez des souches de *PMP*.** Ce gène est spécifique chez *A. baumannii*, ce qui nous amène à penser que l'épidémiologie des gènes codant pour une carbapénémase a changé grâce au transfert horizontal de plasmides portant le gène *bla_{OXA-24}* entre les différents groupes bactériens. L'acquisition de la résistance aux carbapénèmes chez *P. mirabilis* peut être une préoccupation importante pour les médecins car ce germe est généralement résistants à la colistine [4] et il n'est pas très sensible à la tigécycline [375].

Quant à la résistance aux aminosides, **nous avons détecté pour la première fois en Algérie l'émergence de souches de *PMP* productrices des gènes *aadA1*, *aadA2*, *armA*, *aac(6')-Ib*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-I***, qui confère la résistance à tous les aminosides cliniquement pertinents au niveau de CHU de Constantine, rendant ainsi les options du traitement des infections causées par ces germes plus restreintes. De plus, la présence des 2

de ces déterminants de résistance (*aadA2* et *armA*) sur un plasmide conjugatif favorise leur mobilité et leur dissémination.

Aucun gène de résistance aux fluoroquinolones n'a été identifié (*qnrA* et *qnrB*), sauf pour une seule souche de *P. mirabilis* qui s'est révélée porteuse de gène *aac(6')-Ib-cr* qui confère une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et à la norfloxacine. Pour les autres souches la résistance est probablement due à des mutations au niveau des gènes de la gyrase et de la topoisomérase, cibles de cette classe d'antibiotique.

La colistine n'a pas d'effet sur les *PMP*, cependant, lors de notre travail sur la sensibilité aux antibiotiques, nous assistons à la première description des souches de *P. vulgaris* sensibles à la colistine sans comprendre la cause de ce phénomène exceptionnel. Des tests complémentaires devraient être menés pour que cette étude soit complète, par la recherche de mutations au niveau des gènes responsables de la résistance à la colistine, tel que *lpxA,B,C,D*, *pmrA,B*, *phoP,Q*, *mgrB*. De plus, un projet de séquençage du génome complet de ces souches de *P. vulgaris* sensible à la colistine est en cours de réalisation, d'une part afin de bien comprendre toutes les différences existantes entre ces souches et les souches de *P. vulgaris* naturellement résistantes à cet antibiotique, et d'une autre part puisque jusqu'à présent il n'existe aucune étude complète sur le génome de *P. vulgaris* publié.

L'augmentation et l'émergence des différentes combinaisons de déterminants de la résistance aux antibiotiques nous laissent perplexes pour l'avenir de la thérapie antimicrobienne en Algérie. C'est un problème de santé publique, ce qui nécessite une surveillance attentive et la mise en œuvre d'une politique d'utilisation des antibiotiques aussi bien au sein de la communauté qu'à l'hôpital. Les infections nosocomiales ne peuvent être totalement évitées mais le respect strict des règles d'hygiène permet de diminuer le risque.

Pour un meilleur suivi de l'infection, l'identification rapide et précise est nécessaire. Nous avons entrepris une technique par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS). Nos données montrent que la MALDI-TOF est une technique qui peut, maintenant, identifier directement les souches appartenant à une grande série d'isolats cliniques de *PMP* au niveau de l'espèce en moins de 5 minutes par échantillon, avec un moindre coût par rapport aux méthodes classiques et avec une précision égale ou supérieure. La précision de

la spectrométrie de masse va réduire l'utilisation de techniques d'identifications moléculaires telles que le séquençage de l'ARNr 16S, qui sont fastidieuses et coûteuses. Ce problème peut être résolu si nous pensons à la mise en place d'un réseau de plates-formes d'analyse, par l'achat d'au moins d'un appareil de Bruker Biotyper et le placer dans un hôpital universitaire principal et de mettre en place un système de courrier afin de partager l'instrument pour l'usage commun dans tous les hôpitaux universitaires d'Algérie, comme cela a été proposé dans une étude récente à Bruxelles [376].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Frasca D., Dahyot-Fizelier C., Mimoz O., Mimoz O. La colistine en réanimation. *Réanimation* 2008;17:251-8.
- [2] Stahl JP. [Tigecycline: a new antibiotic in ongoing clinical development]. *Med Mal Infect* 2005 Feb;35(2):62-7.
- [3] Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* 2006 Jun;119(6 Suppl 1):S3-10.
- [4] O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev* 2000 Oct;13(4):534-46.
- [5] Manos J, Belas R. The Genera *Proteus* , *Providencia* , and *Morganella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*. Springer New York; 2006. p. 245-69.
- [6] Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003 Nov;47(4):273-95.
- [7] Kim JY, Park YJ, Kim SI, Kang MW, Lee SO, Lee KY. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2004 Dec;54(6):1144-7.
- [8] Vourli S, Tsorlini H, Katsifa H, Polemis M, Tzouvelekis LS, Kontodimou A, et al. Emergence of *Proteus mirabilis* carrying the bla metallo-beta-lactamase gene. *Clin Microbiol Infect* 2006 Jul;12(7):691-4.
- [9] Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, et al. Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jun;46(6):2004-6.

- [10] Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Feb;45(2):583-8.
- [11] Pignato S, Giammanco GM, Grimont F, Grimont PA, Giammanco G. Molecular characterization of the genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. *J Clin Microbiol* 1999 Sep;37(9):2840-7.
- [12] Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001 Dec;6(4):313-21.
- [13] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009 Aug 15;49(4):543-51.
- [14] Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2009 Aug;15(8):796-802.
- [15] Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect* 2010 Nov;16(11):1620-5.
- [16] Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis* 2013 Sep;17(9):e739-e743.
- [17] Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7(2):e31676.

- [18] Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Lndraud L, et al. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS One 2013;8(4):e61428.
- [19] Singh SB, Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. Biochem Pharmacol 2006 Mar 30;71(7):1006-15.
- [20] Bégué P, Astruc J. Pathologie infectieuse de l'enfant. Masson edn. 1999.
- [21] Perronne C. Les maladies infectieuses. Doin edn. 1999.
- [22] Kipnis É., Guery B.P. Réévaluation de la colistine. Antibiotiques 2010;12:205-27.
- [23] Bourinbaiar AS, Coleman CF. The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 in vitro. Arch Virol 1997;142(11):2225-35.
- [24] Le Minor L, Véron M. Bactériologie médicale. Médecine Sciences Publications edn. 1989.
- [25] Houvenaeghel M. Les aminosides. In: Arnette Blackwell, editor. Antibiothérapie en réanimation et chirurgie. 1992. p. 15-25.
- [26] Thévenot P. De l'antibiogramme à la prescription. BioMérieux edn. 2003.
- [27] Tenstet D. Quiz: "Dermato-allergologie et toxiderme". In: John Libbey Eurotext, editor. Progrès en Dermato-Allergologie. Tome XVI. Strasbourg: 2010. p. 133-62.
- [28] Andriole VT. The Quinolones. 2000.
- [29] Hooper DC, Rubinstein E. Quinolone antimicrobial agents. 2003.
- [30] Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Yamanaka L.M., Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1991 Aug;35(8):1647-50.

- [31] Mitscher LA, Devasthale P, Zavod R. Structure-Activity Relationships. In: Washington DC, editor. Quinolone antimicrobial agents. 2 edn. American Society for Microbiology Press; 2003. p. 3-51.
- [32] Shen LI. Quinolone-DNA interaction. Quinolone antimicrobial agents. 2 edn. ASM Press; 2003. p. 77-95.
- [33] Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. Rev Infect Dis 1988 Jul;10(4):677-8.
- [34] Robin F, Gibold L, Bonnet R. Résistances naturelles et acquises aux b-lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. Revue Francophone des laboratoires 2012; 445:47-58.
- [35] Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo JD, Jeannot K. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des laboratoires 2011;435:49-62.
- [36] Philippon A, Arlet G. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork. Ann Biol Clin (Paris) 2006 Jan;64(1):37-51.
- [37] Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004 Jan;48(1):1-14.
- [38] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980 May 16;289(1036):321-31.
- [39] Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002 Jun;8(6):321-31.
- [40] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995 Jun;39(6):1211-33.
- [41] Ruppé E. Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. Antibiotiques 2010;12:3-16.

- [42] Grall N, Andremont A, Armand-Lefèvre L. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des Anti-Infectieux* 2011 Jun;13(2):87-102.
- [43] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001 Oct;14(4):933-51, table.
- [44] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005 Oct;18(4):657-86.
- [45] Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 1999 Nov;5(11):865-79.
- [46] Thomson KS, Smith Moland E. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect* 2000 Aug;2(10):1225-35.
- [47] Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000 Oct;3(5):489-95.
- [48] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Can J Microbiol* 2004 Mar;50(3):137-65.
- [49] Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Attoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003 Aug;41(8):3542-7.
- [50] Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Mar;44(3):622-32.
- [51] Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Aug;47(8):2385-92.

- [52] Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004 Jun;42(6):2523-9.
- [53] De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, et al. Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Sep;46(9):3031-4.
- [54] Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jan;46(1):1-11.
- [55] Hanson ND. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother* 2003 Jul;52(1):2-4.
- [56] Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Arlet G. News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathol Biol (Paris)* 2014 Jun;62(3):169-78.
- [57] Benz R. Bacterial and Eukaryotic Porins- Structure, Function, Mechanism. s.l edn. 2004.
- [58] Hancock RE. Role of porins in outer membrane permeability. *J Bacteriol* 1987 Mar;169(3):929-33.
- [59] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003 Dec;67(4):593-656.
- [60] Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994 Apr 15;264(5157):382-8.
- [61] Charrel RN, Pages JM, De Micco P, Mallea M. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Dec;40(12):2854-8.
- [62] Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a

- plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 Mar;41(3):563-9.
- [63] Thiolas A, Bollet C, La Scola B, Raoult D, Pages JM. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Apr;49(4):1354-8.
- [64] Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008 Mar;32(2):234-58.
- [65] Hedge PJ, Spratt BG. Resistance to beta-lactam antibiotics by re-modelling the active site of an *E. coli* penicillin-binding protein. *Nature* 1985 Dec 5;318(6045):478-80.
- [66] Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001 Oct;183(20):5803-12.
- [67] Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006 Apr;19(2):382-402.
- [68] Schatz A, Waksman SA. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1944;57:244-8.
- [69] Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007 Jul 1;45(1):88-94.
- [70] Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005 Feb;105(2):477-98.
- [71] Courvalin P. New plasmid-mediated resistances to antimicrobial agents. *Arch Microbiol* 2008 Apr;189(4):289-91.
- [72] Llano-Sotelo B, Azucena EF Jr, Kotra LP, Mobashery S, Chow CS. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem Biol* 2002 Apr;9(4):455-63.

- [73] Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993 Mar;57(1):138-63.
- [74] Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010 Dec;13(6):151-71.
- [75] Novick RP, Clowes RC, Cohen SN, Curtiss R, III, Datta N, Falkow S. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* 1976 Mar;40(1):168-89.
- [76] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Aug;47(8):2565-71.
- [77] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003 Dec 6;362(9399):1888-93.
- [78] Bercot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011 Dec;71(4):442-5.
- [79] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Jul;56(7):3960-2.
- [80] Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* 2012 Jun;15(3):133-48.
- [81] Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al. Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother* 2009 Jun;63(6):1205-14.

- [82] Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Sep;55(9):4224-9.
- [83] Deng Y, He L, Chen S, Zheng H, Zeng Z, Liu Y, et al. F33:A-B- and F2:A-B-plasmids mediate dissemination of *rmtB*-*bla*CTX-M-9 group genes and *rmtB*-*qepA* in Enterobacteriaceae isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Oct;55(10):4926-9.
- [84] Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2004 Dec;54(6):1007-12.
- [85] Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011 Jan;66(1):48-53.
- [86] Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*KPC-2, *bla*DHA-1, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Sep;54(9):3967-9.
- [87] Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Zawidzka E, Sulikowska A, Wardak S, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Jan;55(1):443-6.
- [88] Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated *spm-1*-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Apr;52(4):1587-8.
- [89] Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira GD, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Sep;51(9):3388-90.

- [90] Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Itoh T, Tomizawa JI. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Nov;74(11):4772-6.
- [91] Sugino A, Peebles CL, Kreuzer KN, Cozzarelli NR. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Nov;74(11):4767-71.
- [92] Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 2000 Jul;46 Suppl T1:17-24.
- [93] Cattoir V. Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Revue Francophone des laboratoires* 2012;445:79-87.
- [94] Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997 Sep;61(3):377-92.
- [95] Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005 May;25(5):358-73.
- [96] Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005 Jul 15;41 Suppl 2:S120-S126.
- [97] Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003 May;51(5):1109-17.
- [98] Hirai K, Aoyama H, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986 Mar;29(3):535-8.
- [99] Mitsuyama J, Itoh Y, Takahata M, Okamoto S, Yasuda T. In vitro antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992 Sep;36(9):2030-6.

- [100] Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1996 Oct;178(20):5853-9.
- [101] Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000 Dec;64(4):672-93.
- [102] Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998 Mar 14;351(9105):797-9.
- [103] Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Apr 16;99(8):5638-42.
- [104] Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jul;49(7):3050-2.
- [105] Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Feb;53(2):603-8.
- [106] Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Feb;49(2):801-3.
- [107] Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, et al. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Apr;50(4):1178-82.
- [108] Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 May;53(5):1892-7.
- [109] Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol* 2012;3:24.

- [110] Rodriguez-Martinez JM, Cano ME, Velasco C, Martinez-Martinez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 2011 Apr;17(2):149-82.
- [111] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006 Jan;12(1):83-8.
- [112] Mérens A, ervonet A. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue Francophone des laboratoires* 2010;422:33-41.
- [113] Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009 Oct;22(4):664-89.
- [114] Perichon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Jul;51(7):2464-9.
- [115] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Sep;51(9):3354-60.
- [116] Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, et al. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6)-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Aug;52(8):2992-3.
- [117] Rózalski A, Staczek P. *Proteus*. In: Liu D, editor. *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. United States of America: Taylor and Francis Group, LLC; 2009. p. 217-30.
- [118] Giammanco G, Pignato S, Agodi A. A simple chromogenic test for rapid screening of *Proteus* and *Providencia* bacteria. *Microbiologica* 1985 Oct;8(4):395-7.

- [119] Polster M, Svobodova M. Production of reddish-brown pigment from dl-tryptophan by *enterobacteria* of the *Proteus-providencia* group. *Experientia* 1964 Nov 15;20(11):637-8.
- [120] Muller HE. Production of brownish pigment by bacteria of the *Morganella-Proteus-Providencia* group. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene A* 1985 Dec;260(4):428-35.
- [121] Sheth NK, Kurup VP. Evaluation of tyrosine medium for the identification of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1975 May;1(5):483-5.
- [122] Hauser G. *About not bacteria and their relationship to Septicämia*. Vogel Leipzig 1985;107.
- [123] Cosenza BJ, Podgwaite JD. A new species of *Proteus* isolated from larvae of the gypsy moth *Porthetria dispar* (L.). *Antonie Van Leeuwenhoek* 1966;32(2):187-91.
- [124] Hickman FW, Steigerwalt AG, Farmer JJIII, Brenner DJ. Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 1. *J Clin Microbiol* 1982 Jun;15(6):1097-102.
- [125] O'Hara CM, Brenner FW, Steigerwalt AG, Hill BC, Holmes B, Grimont PA, et al. Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri* sp. nov., nom. rev. and unnamed *Proteus* genomospecies 4, 5 and 6. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000 Sep;50 Pt 5:1869-75.
- [126] Janda JM, Abbot SL. The genus *Proteus*. In: 2nd, editor. *The Enterobacteriaceae*. Washington, DC: ASM Press; 2006.
- [127] Giammanco GM, Grimont PA, Grimont F, Lefevre M, Giammanco G, Pignato S. Phylogenetic analysis of the genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* by comparison of rpoB gene sequences of type and clinical strains suggests the reclassification of *Proteus myxofaciens* in a new genus, *Cosenzaea* gen. nov., as *Cosenzaea myxofaciens* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011 Jul;61(Pt 7):1638-44.

- [128] Phillips JE. In vitro studies on *Proteus* organisms of animal origin. J Hyg (Lond) 1955 Mar;53(1):26-31.
- [129] Senior BW. *Proteus, Morganella, and Providencia*. In: ColierL., editor. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Arnold, London, UK: 1998. p. 1035.
- [130] Graber CD, Lincoln AF. Infantile diarrhea in the Denver area: significance of *Proteus-Providencia* organisms. Pediatrics 1955 Nov;16(5):585-9.
- [131] Muller HE. Occurrence and pathogenic role of *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria in human feces. J Clin Microbiol 1986 Feb;23(2):404-5.
- [132] Muller HE. The role of *Proteae* in diarrhea. Zentralbl Bakteriol 1989 Nov;272(1):30-5.
- [133] Gonzalez-Rodriguez MN, Sanz JJ, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. Int J Food Microbiol 2002 Jul 25;77(1-2):161-8.
- [134] Fernandez-Delgado M, Contreras M, Garcia-Amado MA, Gueneau P, Suarez P. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of venezuelan oysters. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2007 Nov;49(6):355-9.
- [135] Donkor E, Aning K, Quaye J. Bacterial contaminations of informally marketed raw milk in ghana. Ghana Med J 2007 Jun;41(2):58-61.
- [136] Deetae P, Bonnarne P, Spinnler HE, Helinck S. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. Appl Microbiol Biotechnol 2007 Oct;76(5):1161-71.
- [137] Coker C., Poore C.A., Li X., Mobley H.L. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. Microbes Infect 2000 Oct;2(12):1497-505.
- [138] McLean RJ, Nickel JC, Cheng KJ, Costerton JW. The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract. Crit Rev Microbiol 1988;16(1):37-79.

- [139] Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995 Sep;59(3):451-80.
- [140] Jones BD, Mobley HL. *Proteus mirabilis* urease: genetic organization, regulation, and expression of structural genes. *J Bacteriol* 1988 Aug;170(8):3342-9.
- [141] Nicholson EB, Concaugh EA, Mobley HL. *Proteus mirabilis* urease: use of a ureA-lacZ fusion demonstrates that induction is highly specific for urea. *Infect Immun* 1991 Oct;59(10):3360-5.
- [142] Griffith DP, Musher DM, Itin C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. *Invest Urol* 1976 Mar;13(5):346-50.
- [143] Stickler D, Ganderton L, King J, Nettleton J, Winters C. *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urol Res* 1993;21(6):407-11.
- [144] Dumanski AJ, Hedelin H, Edin-Liljegren A, Beauchemin D, McLean RJ. Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. *Infect Immun* 1994 Jul;62(7):2998-3003.
- [145] Rozalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997 Mar;61(1):65-89.
- [146] Li X, Zhao H, Lockett CV, Drachenberg CB, Johnson DE, Mobley HL. Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. *Infect Immun* 2002 Jan;70(1):389-94.
- [147] Stickler DJ, Zimakoff J. Complications of urinary tract infections associated with devices used for long-term bladder management. *J Hosp Infect* 1994 Nov;28(3):177-94.
- [148] Johnson DE, Russell RG, Lockett CV, Zulty JC, Warren JW, Mobley HL. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 1993 Jul;61(7):2748-54.

- [149] Jones BD, Lockatell CV, Johnson DE, Warren JW, Mobley HL. Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 1990 Apr;58(4):1120-3.
- [150] Mulks MH, Shoberg RJ. Bacterial immunoglobulin A1 proteases. *Methods Enzymol* 1994;235:543-54.
- [151] Wassif C, Cheek D, Belas R. Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* 1995 Oct;177(20):5790-8.
- [152] Senior BW, Loomes LM, Kerr MA. Microbial IgA Proteases and Virulence. *Reviews in Medical Microbiology* 1991;43:176-84.
- [153] Senior BW, Loomes LM, Kerr MA. The production and activity in vivo of *Proteus mirabilis* IgA protease in infections of the urinary tract. *J Med Microbiol* 1991 Oct;35(4):203-7.
- [154] Kornfeld SJ, Plaut AG. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. *Rev Infect Dis* 1981 May;3(3):521-34.
- [155] Belas R, Manos J, Suvanasuthi R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2004 Sep;72(9):5159-67.
- [156] Walker KE, Moghaddame-Jafari S, Lockatell CV, Johnson D, Belas R. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol* 1999 May;32(4):825-36.
- [157] Uphoff TS, Welch RA. Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium-independent hemolysin genes (hpmA and hpmB) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (shlA and shlB). *J Bacteriol* 1990 Mar;172(3):1206-16.
- [158] Welch RA. Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. *Infect Immun* 1987 Sep;55(9):2183-90.

- [159] Peerbooms PG, Verweij AM, MacLaren DM. Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* 1984 Mar;43(3):1068-71.
- [160] Rozalski A, Dlugonska H, Kotelko K. Cell invasiveness of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* strains. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1986;34(5-6):505-12.
- [161] Allison C, Lai HC, Hughes C. Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* 1992 Jun;6(12):1583-91.
- [162] Pearson MM, Rasko DA, Smith SN, Mobley HL. Transcriptome of swarming *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* 2010 Jun;78(6):2834-45.
- [163] Swihart KG, Welch RA. Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. *Infect Immun* 1990 Jun;58(6):1861-9.
- [164] Peerbooms PG, Verweij AM, MacLaren DM. Investigation of the haemolytic activity of *Proteus mirabilis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983 Apr;49(1):1-11.
- [165] Alamuri P, Eaton KA, Himpsl SD, Smith SN, Mobley HL. Vaccination with proteus toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin in vivo, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Infect Immun* 2009 Feb;77(2):632-41.
- [166] Alamuri P, Mobley HL. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Mol Microbiol* 2008 May;68(4):997-1017.
- [167] Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J, et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* 2008 Oct;16(10):496-506.
- [168] Morgenstein RM, Szostek B, Rather PN. Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Rev* 2010 Sep;34(5):753-63.

- [169] Allison C, Emody L, Coleman N, Hughes C. The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *J Infect Dis* 1994 May;169(5):1155-8.
- [170] Zunino P, Piccini C, Legnani-Fajardo C. Flagellate and non-flagellate *Proteus mirabilis* in the development of experimental urinary tract infection. *Microb Pathog* 1994 May;16(5):379-85.
- [171] Pearson MM, Sebahia M, Churcher C, Quail MA, Seshasayee AS, Luscombe NM, et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J Bacteriol* 2008 Jun;190(11):4027-37.
- [172] Bahrani FK, Mobley HL. *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide sequence, and conditions for expression. *J Bacteriol* 1994 Jun;176(11):3412-9.
- [173] Li X, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL. Repression of bacterial motility by a novel fimbrial gene product. *EMBO J* 2001 Sep 3;20(17):4854-62.
- [174] Pearson MM, Mobley HL. Repression of motility during fimbrial expression: identification of 14 *mrpJ* gene paralogues in *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* 2008 Jul;69(2):548-58.
- [175] Zhao H, Li X, Johnson DE, Blomfield I, Mobley HL. In vivo phase variation of MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract. *Mol Microbiol* 1997 Mar;23(5):1009-19.
- [176] Bahrani FK, Johnson DE, Robbins D, Mobley HL. *Proteus mirabilis* flagella and MR/P fimbriae: isolation, purification, N-terminal analysis, and serum antibody response following experimental urinary tract infection. *Infect Immun* 1991 Oct;59(10):3574-80.
- [177] Silverblatt FJ, Ofek I. Influence of pili on the virulence of *Proteus mirabilis* in experimental hematogenous pyelonephritis. *J Infect Dis* 1978 Nov;138(5):664-7.

- [178] Massad G, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL. *Proteus mirabilis* fimbriae: construction of an isogenic pmfA mutant and analysis of virulence in a CBA mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 1994 Feb;62(2):536-42.
- [179] Altman E, Harrison BA, Latta RK, Lee KK, Kelly JF, Thibault P. Galectin-3-mediated adherence of *Proteus mirabilis* to Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem Cell Biol* 2001;79(6):783-8.
- [180] Lee KK, Harrison BA, Latta R, Altman E. The binding of *Proteus mirabilis* nonagglutinating fimbriae to ganglio-series asialoglycolipids and lactosyl ceramide. *Can J Microbiol* 2000 Oct;46(10):961-6.
- [181] Wray SK, Hull SI, Cook RG, Barrish J, Hull RA. Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* 1986 Oct;54(1):43-9.
- [182] Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Survey of antimicrobial activity of four commonly used third generation cephalosporins tested against recent bacterial isolates from ten American medical centers, and assessment of disk diffusion test performance. *AST Surveillance Group. Diagn Microbiol Infect Dis* 1996 Apr;24(4):213-9.
- [183] Ronald AR. Urethritis and cystitis. In: Hoepfich PD JMRA, editor. *Infectious disease: a treatise of infectious processes*. 5th edn. Philadelphia Pa.: Lippincott J; 1994. p. 564-70.
- [184] Thornsberry C, Yee YC. Comparative activity of eight antimicrobial agents against clinical bacterial isolates from the United States, measured by two methods. *Am J Med* 1996 Jun 24;100(6A):26S-38S.
- [185] Yao J DC, Moellering RCJr. Antibacterial agents. In: Murray PR, et al., editors. *Manual of clinical microbiology*. 7th edn. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 1474-504.
- [186] Thomson KS, Sanders WE, Sanders CC. USA resistance patterns among UTI pathogens. *J Antimicrob Chemother* 1994 May;33 Suppl A:9-15.

- [187] Chow AW, Taylor PR, Yoshikawa TT, Guze LB. A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. *J Infect Dis* 1979 Jun;139(6):621-7.
- [188] Dance DA, Pearson AD, Seal DV, Lowes JA. A hospital outbreak caused by a chlorhexidine and antibiotic-resistant *Proteus mirabilis*. *J Hosp Infect* 1987 Jul;10(1):10-6.
- [189] Burke JP, Ingall D, Klein JO, Gezon HM, Finland M. *Proteus mirabilis* infections in a hospital nursery traced to a human carrier. *N Engl J Med* 1971 Jan 21;284(3):115-21.
- [190] Biedenbach DJ, Jones RN. Predictive accuracy of disk diffusion test for *Proteus vulgaris* and *Providencia* species against five newer orally administered cephalosporins, cefdinir, cefetamet, cefprozil, cefuroxime, and loracarbef. *J Clin Microbiol* 1994 Feb;32(2):559-62.
- [191] Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 1995 Oct;63(10):3904-13.
- [192] Braunstein H, Tomasulo M. Identification of *Proteus morgani* and distinction from other *Proteus* species. *Am J Clin Pathol* 1978 Dec;70(6):905-8.
- [193] Hawkey PM, Penner JL, Linton AH, Hawkey CA, Crisp LJ, Hinton M. Speciation, serotyping, antimicrobial sensitivity and plasmid content of *Proteaeae* from the environment of calf-rearing units in South West England. *J Hyg (Lond)* 1986 Dec;97(3):405-17.
- [194] Prasad LB, Pandey SP. Isolation of *Proteus morgani* from an atypical form of fatal gastro-enteritis in cattle. *Indian Vet J* 1966 Sep;43(9):767-70.
- [195] Tanaka M, Takuma H, Kokumai N, Oishi E, Obi T, Hiramatsu K, et al. Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan. *J Vet Med Sci* 1995 Oct;57(5):939-41.

- [196] Lin MY, Cheng MC, Huang KJ, Tsai WC. Classification, pathogenicity, and drug susceptibility of hemolytic gram-negative bacteria isolated from sick or dead chickens. *Avian Dis* 1993 Jan;37(1):6-9.
- [197] Muller HE. Aerobic faecal flora of reptiles with special reference to the enterobacteria of snakes. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 1972 Dec;222(4):487-95.
- [198] Thornton SM, Nolan S, Gulland FM. Bacterial isolates from California sea lions (*Zalophus californianus*), harbor seals (*Phoca vitulina*), and northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast, 1994-1995. *J Zoo Wildl Med* 1998 Jun;29(2):171-6.
- [199] Senior BW, Leslie DL. Rare occurrence of *Proteus vulgaris* in faeces: a reason for its rare association with urinary tract infections. *J Med Microbiol* 1986 Mar;21(2):139-44.
- [200] Senior BW. *Proteus morgani* is less frequently associated with urinary tract infections than *Proteus mirabilis*--an explanation. *J Med Microbiol* 1983 Aug;16(3):317-22.
- [201] Bagel J, Grossman ME. Hemorrhagic bullae associated with *Morganella morganii* septicemia. *J Am Acad Dermatol* 1985 Mar;12(3):575-6.
- [202] Barragan Casas JM, Hernandez Hernandez JM, Garcinuno Jimenez MA, Gonzalo Molina MA, Carbonero DP, Ibanez R, et al. Bacteremia caused by digestive system endoscopy. *Rev Esp Enferm Dig* 1999 Feb;91(2):105-16.
- [203] Heard DJ, Jacobson ER, Clemmons RE, Campbell GA. Bacteremia and septic arthritis in a West African dwarf crocodile. *J Am Vet Med Assoc* 1988 May 15;192(10):1453-4.
- [204] McDermott C, Mylotte JM. *Morganella morganii*: epidemiology of bacteremic disease. *Infect Control* 1984 Mar;5(3):131-7.
- [205] Novak SS, Seigel RA. Gram-negative septicemia in American alligators (*Alligator mississippiensis*). *J Wildl Dis* 1986 Oct;22(4):484-7.

- [206] Rowen JL, Lopez SM. *Morganella morganii* early onset sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 1998 Dec;17(12):1176-7.
- [207] Nicholson E.B., Concaugh E.A., Mobley H.L. *Proteus mirabilis* urease: use of a ureA-lacZ fusion demonstrates that induction is highly specific for urea. *Infect Immun* 1991 Oct;59(10):3360-5.
- [208] Emody L, Pal T, Safonova NV, Kuch B, Golutva NK. alpha-Haemolysin: an additive virulence factor in *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1980;27(4):333-42.
- [209] Koronakis V, Cross M, Senior B, Koronakis E, Hughes C. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1987 Apr;169(4):1509-15.
- [210] Jones BD, Mobley HL. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect Immun* 1987 Sep;55(9):2198-203.
- [211] Young GM, Amid D, Miller VL. A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J Bacteriol* 1996 Nov;178(22):6487-95.
- [212] Biedenbach DJ, Jones RN, Erwin ME. Interpretive accuracy of the disk diffusion method for testing newer orally administered cephalosporins against *Morganella morganii*. *J Clin Microbiol* 1993 Oct;31(10):2828-30.
- [213] Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In: Murray PR et al, editor. *Manual of clinical microbiology*. 7th edn. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 1593-600.
- [214] Biedenbach DJ, Jones RN. Interpretive errors using an automated system for the susceptibility testing of imipenem and aztreonam. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;21:57-60.

- [215] York MK, Brooks GF, Fiss EH. Evaluation of the autoSCAN-W/A rapid system for identification and susceptibility testing of gram-negative fermentative bacilli. *J Clin Microbiol* 1992 Nov;30(11):2903-10.
- [216] Ewing WH. The tribe *Proteae*: its nomenclature and taxonomy. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 1962;12:93-102.
- [217] Brenner DJ, Farmer III JJ, Fanning GR, Steigerwalt AG, Klykken P, Wathen HG, et al. Deoxyribonucleic acid relatedness in species of *Proteus* and *Providencia*. *Int j Syst Bacteriol* 1978;28:269-82.
- [218] Hickman-Brenner FW, Farmer JJ, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Providencia rustigianii*: a new species in the family *Enterobacteriaceae* formerly known as *Providencia alcalifaciens* biogroup 3. *J Clin Microbiol* 1983 Jun;17(6):1057-60.
- [219] Muller HE. *Providencia friedericiana*, a New Species Isolated from Penguins. *Int j Syst Bacteriol* 1983;33(4):709-15.
- [220] Muller HE, O'Hara CM, Fanning GR, Hickman- Brenner FW, Swensen JM, Brenner DJ. *Providencia heimbachae*, a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from animals. *Int j Syst Bacteriol* 1986;36:252-6.
- [221] Mohr O'Hara C, Steigerwalt AG, Green D, McDowell M, Hill BC, Brenner DJ, et al. Isolation of *Providencia heimbachae* from human feces. *J Clin Microbiol* 1999 Sep;37(9):3048-50.
- [222] Warren JW. *Providencia stuartii*: a common cause of antibiotic-resistant bacteriuria in patients with long-term indwelling catheters. *Rev Infect Dis* 1986 Jan;8(1):61-7.
- [223] Penner JL. Genus XI *Proteus*. In: Kreig NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1 edn. Baltimore MD.: Williams and Wilkins; 1984. p. 491-4.
- [224] Stickler DJ, Fawcett C, Chawla JC. *Providencia stuartii*: a search for its natural habitat. *J Hosp Infect* 1985 Jun;6(2):221-3.

- [225] Bauernfeind A, Wiersma G. [Nosocomial infections of the urinary tract by *Proteus rettgeri* (author's transl)]. *Immun Infekt* 1977 Aug;5(4):138-41.
- [226] Cipriani S, Pannelli F, Picciola AR, Rocchi T. [Urine bacterial flora and chemoantibiotic resistance: observations on ambulatory patients and hospitalized patients at the local health district No. 11 of Fabriano (Ancona)]. *Quad Sclavo Diagn* 1988 Jan;24(1-4):225-37.
- [227] Gunalp A. [The role of enteric bacteria in childhood urinary tract infections and their in vitro response to antimicrobial agents]. *Mikrobiyol Bul* 1979 Jan;13(1):13-25.
- [228] Mino Y, Kitano S, Morimoto S, Ogihara T. [Urinary bacteria in elderly patients with urinary incontinence and low levels of daily activity]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 1997 Dec;34(12):1004-8.
- [229] Janda JM, Abbott SL, Woodward D, Khashe S. Invasion of HEp-2 and other eukaryotic cell lines by *Providenciae*: further evidence supporting the role of *Providencia alcalifaciens* in bacterial gastroenteritis. *Curr Microbiol* 1998 Sep;37(3):159-65.
- [230] Costas M, Holmes B, Sloss LL. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Providencia rustigianii* strains from human diarrhoea and other sources. *J Appl Bacteriol* 1987 Oct;63(4):319-28.
- [231] Higashitani A, Higashitani N, Horiuchi K. A cell division inhibitor SulaA of *Escherichia coli* directly interacts with FtsZ through GTP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Apr 6;209(1):198-204.
- [232] Muder RR, Brennen C, Wagener MM, Goetz AM. Bacteremia in a long-term-care facility: a five-year prospective study of 163 consecutive episodes. *Clin Infect Dis* 1992 Mar;14(3):647-54.
- [233] Rahav G, Pinco E, Silbaq F, Bercovier H. Molecular epidemiology of catheter-associated bacteriuria in nursing home patients. *J Clin Microbiol* 1994 Apr;32(4):1031-4.

- [234] Rudman D, Hontanosas A, Cohen Z, Mattson DE. Clinical correlates of bacteremia in a Veterans Administration extended care facility. *J Am Geriatr Soc* 1988 Aug;36(8):726-32.
- [235] Woods TD, Watanakunakorn C. Bacteremia due to *Providencia stuartii*: review of 49 episodes. *South Med J* 1996 Feb;89(2):221-4.
- [236] Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1987 Dec;1(4):823-54.
- [237] Gomez-Lus R, Rubio Calvo MC, Mur LL. Aminoglycoside inactivating enzymes produced by R plasmids of *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* and *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* 1977 Nov;3 Suppl C:39-41.
- [238] Paradise MR, Cook G, Poole RK, Rather PN. Mutations in *aarE*, the *ubiA* homolog of *Providencia stuartii*, result in high-level aminoglycoside resistance and reduced expression of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Apr;42(4):959-62.
- [239] Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens* and *P. rustigianii* strains. *J Med Microbiol* 1998 Jul;47(7):629-42.
- [240] Swiatlo E, Kocka FE. Inducible expression of an aminoglycoside-acetylating enzyme in *Providencia stuartii*. *J Antimicrob Chemother* 1987 Jan;19(1):27-30.
- [241] McHale PJ, Walker F, Scully B, English L, Keane CT. *Providencia stuartii* infections: a review of 117 cases over an eight year period. *J Hosp Infect* 1981 Jun;2(2):155-65.
- [242] Prentice B, Robinson BL. A review of *Providencia* bacteremia in a general hospital, with a comment on patterns of antimicrobial sensitivity and use. *Can Med Assoc J* 1979 Sep 22;121(6):745-9.
- [243] Keren G, Tyrrel DL. Gram-negative septicemia caused by *Providencia stuartii*. *Int J Pediatr Nephrol* 1987 Apr;8(2):91-4.

- [244] Penner JL, Preston MA. Differences among *Providencia* species in their in vitro susceptibilities to five antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1980 Dec;18(6):868-71.
- [245] Penner JL, Preston MA, Hennessy JN, Barton LJ, Goodbody MM. Species differences in susceptibilities of *Proteeae* spp. to six cephalosporins and three aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1982 Aug;22(2):218-21.
- [246] Piccolomini R, Cellini L, Allocati N, Di GA, Ravagnan G. Comparative in vitro activities of 13 antimicrobial agents against *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria from urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1987 Oct;31(10):1644-7.
- [247] Albert MJ, Alam K, Ansaruzzaman M, Islam MM, Rahman AS, Haider K, et al. Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens*-induced diarrhea. *Infect Immun* 1992 Dec;60(12):5017-24.
- [248] Albert MJ, Faruque AS, Mahalanabis D. Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children. *J Clin Microbiol* 1998 May;36(5):1433-5.
- [249] Guth BE, Perrella E. Prevalence of invasive ability and other virulence-associated characteristics in *Providencia alcalifaciens* strains isolated in Sao Paulo, Brazil. *J Med Microbiol* 1996 Dec;45(6):459-62.
- [250] Haynes J, Hawkey PM. *Providencia alcalifaciens* and travellers' diarrhoea. *BMJ* 1989 Jul 8;299(6691):94-5.
- [251] SEN R. Isolation of strains of the *Providence* group from cases with diarrhoea in Ibadan, Nigeria, West Africa. *Indian J Med Res* 1962 Jul;50:622-6.
- [252] Mathan MM, Mathan VI, Albert MJ. Electron microscopic study of the attachment and penetration of rabbit intestinal epithelium by *Providencia alcalifaciens*. *J Pathol* 1993 Sep;171(1):67-71.
- [253] Mobley HL, Chippendale GR, Tenney JH, Warren JW. Adherence to uroepithelial cells of *Providencia stuartii* isolated from the catheterized urinary tract. *J Gen Microbiol* 1986 Oct;132(10):2863-72.

- [254] Mobley HL, Chippendale GR, Tenney JH, Mayrer AR, Crisp LJ, Penner JL, et al. MR/K hemagglutination of *Providencia stuartii* correlates with adherence to catheters and with persistence in catheter-associated bacteriuria. *J Infect Dis* 1988 Feb;157(2):264-71.
- [255] Penner JL, Hinton NA, Whiteley GR, Hennessy JN. Variation in urease activity of endemic hospital strains of *Proteus rettgeri* and *Providencia stuartii*. *J Infect Dis* 1976 Oct;134(4):370-6.
- [256] Kunin CM. Blockage of urinary catheters: role of microorganisms and constituents of the urine on formation of encrustations. *J Clin Epidemiol* 1989;42(9):835-42.
- [257] Stickler D, Morris N, Moreno MC, Sabbuba N. Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998 Sep;17(9):649-52.
- [258] Fletcher M, Oppenheimer SR, Warren JW. Colonization of urinary catheters by *Escherichia coli* and *Providencia stuartii* in a laboratory model system. *J Urol* 1994 Jul;152(1):232-6.
- [259] Cornaglia G, Frugoni S, Mazzariol A, Piacentini E, Berlusconi A, Fontana R. Activities of oral antibiotics on *Providencia* strains isolated from institutionalized elderly patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Dec;39(12):2819-21.
- [260] Spach DH, Liles WC. Antimicrobial therapy for bacterial diseases. In: Root RK, editor. *Clinical infectious diseases: a practical approach*. New York NY: Oxford University Press Inc.; 1999. p. 337-48.
- [261] Fass RJ, Barnishan J, Ayers LW. Emergence of bacterial resistance to imipenem and ciprofloxacin in a university hospital. *J Antimicrob Chemother* 1995 Aug;36(2):343-53.
- [262] Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: Murray PR et al., editor. *Manual of clinical*

- microbiology. 7th edn. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 1563-77.
- [263] Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 1975 Feb;47(2):219-25.
- [264] Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathol Biol (Paris)* 2010 Feb;58(1):55-7.
- [265] Doern G.V. Detection of selected fastidious bacteria. *Clin Infect Dis* 2000 Jan;30(1):166-73.
- [266] Drancourt M. *Tropheryma whippelii*, an emerging intracellular pathogen causing Whipple disease. *Presse Med* 1999 Feb 27;28(8):435-9, 433.
- [267] Hofmann MA, Brian DA. Sequencing DNA amplified directly from a bacterial colony. *Methods Mol Biol* 1993;15:205-10.
- [268] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-73.
- [269] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991 Jan;173(2):697-703.
- [270] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992;24:104-8.
- [271] Adekambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004 Nov;54(Pt 6):2095-105.
- [272] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

- [273] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997 Dec 15;25(24):4876-82.
- [274] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007 Aug;24(8):1596-9.
- [275] Mollet C, Drancourt M, Raoult D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 1997 Dec;26(5):1005-11.
- [276] Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001 Jul;48 Suppl 1:59-64.
- [277] Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol* 2003 Oct;41(10):4623-9.
- [278] Renu G, Rajeev T, Smita S. Existence of Metallo beta lactamases in carbapenem susceptible gram negative bacilli: a cause for concern. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2010;4(4):2679-84.
- [279] Robin F., Gibold L., Bonnet R. Résistances naturelles et acquises aux b-lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires* 2012; 445:47-58.
- [280] Raphael E, Wong LK, Riley LW. Extended-spectrum Beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Appl Environ Microbiol* 2011 Mar;77(5):1601-7.
- [281] de Oliveira GD, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 May;52(5):1790-3.

- [282] Melano R, Corso A, Petroni A, Centron D, Orman B, Pereyra A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2003 Jul;52(1):36-42.
- [283] Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Sep;50(9):3222-4.
- [284] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents* 2006 Apr;27(4):351-3.
- [285] Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2007 Dec;13(12):1192-8.
- [286] Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Detection of aac(6')-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *J Antimicrob Chemother* 2009 Oct;64(4):718-22.
- [287] Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents* 2011 Jun;37(6):544-6.
- [288] Cole JM, Schuetz AN, Hill CE, Nolte FS. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *J Clin Microbiol* 2009 Feb;47(2):322-6.
- [289] Lee H, Koh EM, Kim CK, Yum JH, Lee K, Chong Y. Molecular and Phenotypic Characteristics of 16S rRNA Methylase-producing Gram-negative Bacilli. *Korean Journal of Clinical Microbiology* 2010 Mar 31;13(1):19-26.

- [290] Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex. J Clin Microbiol 2010 Apr;48(4):1132-8.
- [291] Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, De CC. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 2008 Mar;60(3):287-90.
- [292] A.Bahashwan S., M.El Shafey H. Antimicrobial resistance patterns of *Proteus* isolates from clinical specimens. European Scientific Journal 2013 Sep;9(27):188-202.
- [293] O'Hara C.M., Brenner F.W., Miller J.M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. Clin Microbiol Rev 2000 Oct;13(4):534-46.
- [294] Sekowska A., Janicka G., Wroblewska J., Kruszynska E. Prevalence of *Proteus mirabilis* strains in clinical specimens and evaluation of their resistance to selected antibiotics. Pol Merkur Lekarski 2004 Nov;17(101):538-40.
- [295] Feglo P.K., Gbedema S.Y., Quay S.N.A., Adu-Sarkodie Y., Opoku-Okrah C. Occurrence, species distribution and antibiotic resistance of *Proteus* isolates: A case study at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. Int J Pharm Sci Res 2010 Oct;1(9):347-52.
- [296] O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. Clin Microbiol Rev 2000 Oct;13(4):534-46.
- [297] Farmer JJI. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray PR, al., editors. Manual of clinical microbiology. 7th edn. Washington: Washington DC; 1999. p. 442-58.
- [298] Orrett F.A. Prevalence of *Proteus* species in urinary tract infections in a regional hospital in Trinidad. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) 1999 Jul;62(7):438-42.

- [299] CDR Weekly. *Proteus spp*, *Morganella morganii*, and *Providencia spp* bacteraemia, England, Wales, and Northern Ireland: 2000 to 2005. *the Communicable Disease Report Weekly*; 2006 May 11. Report No.: 16 (20).
- [300] Pandey J.K., Narayan A., Tyagi S.
Prevalence of *Proteus* species in clinical samples, antibiotic sensitivity pattern and ESBL production. Page 1 *Int J Curr Microbiol App Sci* 2013 Nov 10;2(10):253-61.
- [301] Kim BN, Kim NJ, Kim MN, Kim YS, Woo JH, Ryu J. Bacteraemia due to tribe *Proteeae*: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). *Scand J Infect Dis* 2003;35(2):98-103.
- [302] Jones R., Vincent B.A., Saunders W.B. Bacteraemia, England, Wales and Northern Ireland: *Commun Dis Rep CDR*. 2003.
- [303] Newman M.J., Frimpong E., Asamoah-Adu A., Sampene-Donkor E. Resistance to antimicrobial drugs in Ghana. The Ghanaian-Dutch Collaboration for Health Research and Development; 2006. Report No.: 5.
- [304] Yah S.C., Eghafona N.O., Ornuisi S., Abouo A.M. Widespread plasmid resistance genes among *Proteus* species in diabetic wounds of patients in the Ahmadu Bello university teaching hospital (ABUTH) Zaria. *Afr J Biotechnol* 2007 Aug 6;6(15):1757-62.
- [305] Reslinski A., Gospodarek E., Mikucka A. Prevalence of multidrug-resistant *Proteus spp.* strains in clinical specimens and their susceptibility to antibiotics. *Med Dosw Mikrobiol* 2005;57(2):175-84.
- [306] Mahamat A, Lavigne JP, Bouziges N, Daures JP, Sotto A. Antimicrobial susceptibility of *Proteus mirabilis* urinary tract isolates from 1999 to 2005 at Nimes University Hospital. *Pathol Biol (Paris)* 2006 Oct;54(8-9):456-61.
- [307] Centers for Disease Control and Prevention. National nosocomial infections surveillance (NNIS) report, data summary October 1986–April 1996. *Am. J. Infect. Control*; 1996. Report No.: 24.

- [308] Saxena S.R., Bassett D.C. Sex-related incidence in proteus infection of the urinary tract in childhood. Arch Dis Child 1975 Nov;50(11):899-901.
- [309] Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J Clin Microbiol 2010 Apr;48(4):1169-75.
- [310] He Y, Li H, Lu X, Stratton CW, Tang YW. Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. J Clin Microbiol 2010 Nov;48(11):3888-92.
- [311] Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010 May;48(5):1549-54.
- [312] Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 2011 Mar;49(3):887-92.
- [313] Carbonnelle E, Grohs P, Jacquier H, Day N, Tenza S, Dewailly A, et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. J Microbiol Methods 2012 May;89(2):133-6.
- [314] Richter SS, Sercia L, Branda JA, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro MJ, et al. Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013 Jul 2.
- [315] Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. J Microbiol Methods 2002 Feb;48(2-3):127-38.

- [316] Robina F., Gibolda L., Bonnetta R. Résistances naturelles et acquises aux - lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? *Revue Francophone des laboratoires* 2012;2012(445):47-58.
- [317] Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 13ème Rapport d'évaluation (Janvier Décembre 2011). 2012.
- [318] Bouchillon S.K., Badal R.E., Hoban D.J., Hawser S.P. Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of gram-negative bacilli in the United States: results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program: 2009-2011. *Clin Ther* 2013 Jun;35(6):872-7.
- [319] Karlowsky J.A., Adam H.J., Baxter M.R., Lagace-Wiens P.R., Walkty A.J., Hoban D.J., et al. In vitro activity of ceftaroline-avibactam against gram-negative and gram-positive pathogens isolated from patients in Canadian hospitals from 2010 to 2012: results from the CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Nov;57(11):5600-11.
- [320] Wang J.T., Chen P.C., Chang S.C., Shiao Y.R., Wang H.Y., Lai J.F., et al. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. *BMC Infect Dis* 2014;14:486.
- [321] Horner C.S., Abberley N., Denton M., Wilcox M.H. Surveillance of antibiotic susceptibility of Enterobacteriaceae isolated from urine samples collected from community patients in a large metropolitan area, 2010-2012. *Epidemiol Infect* 2014 Feb;142(2):399-403.
- [322] Barrow G.I., Feltham R.K.A. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd edn. Cambridge UK.: 2003.
- [323] Dimou V., Dhanji H., Pike R., Livermore D.M., Woodford N. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2012 Jul;67(7):1660-5.

- [324] Societe Francaise de Microbiologie. Lettre d'information du CA-SFM concernant la detection de la production de carbapenemases chez les enterobacteries. 2012 Jan.
- [325] Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008 Jan;14 Suppl 1:42-52.
- [326] Palzkill T, Botstein D. Identification of amino acid substitutions that alter the substrate specificity of TEM-1 beta-lactamase. J Bacteriol 1992 Aug;174(16):5237-43.
- [327] Gonzalez ML, Ramos MA, Nadal BL, Morffi FJ, Hernandez RE, Alvarez AB, et al. [Phenotypic and molecular identification of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) TEM and SHV produced by clinical isolates *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in hospitals]. Rev Cubana Med Trop 2007 Jan;59(1):52-8.
- [328] Howard C, van DA, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and Minisequencing-Based Discrimination of SHV Beta-Lactamases in Nosocomial Infection-Associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. Antimicrob Agents Chemother 2002 Mar;46(3):659-64.
- [329] Berrazeg M, Drissi M, Medjahed L, Rolain JM. Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic-resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. J Med Microbiol 2013 Jun;62(Pt 6):864-74.
- [330] Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, De CC. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. Int J Antimicrob Agents 2006 May;27(5):397-402.
- [331] Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. J Antimicrob Chemother 2002 Sep;50(3):393-6.
- [332] Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. FEMS Microbiol Lett 2001 Jul 24;201(2):237-41.

- [333] Lartigue MF, Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003 Aug;52(2):315-6.
- [334] Mushtaq S, Woodford N, Potz N, Livermore DM. Detection of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2003 Sep;52(3):528-9.
- [335] Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Dec;47(12):3724-32.
- [336] Yu WL, Cheng KC, Wu LT, Pfaller MA, Winokur PL, Jones RN. Emergence of two *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring plasmid-mediated CTX-M-15 beta-lactamase in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jan;48(1):362-3.
- [337] Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, et al. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Apr;48(4):1204-14.
- [338] Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Apr;48(4):1249-55.
- [339] Markovska R, Schneider I, Keuleyan E, Bauernfeind A. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Sofia, Bulgaria. *Clin Microbiol Infect* 2004 Aug;10(8):752-5.
- [340] Conceicao T, Brizio A, Duarte A, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jan;49(1):477-8.

- [341] Moubareck C, Daoud Z, Hakime NI, Hamze M, Mangeney N, Matta H, et al. Countrywide spread of community- and hospital-acquired extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15)-producing *Enterobacteriaceae* in Lebanon. *J Clin Microbiol* 2005 Jul;43(7):3309-13.
- [342] Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Apr;49(4):1572-5.
- [343] Weill FX, Perrier-Gros-Claude JD, Demartin M, Coignard S, Grimont PA. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing strains of *Salmonella enterica* isolated in France and Senegal. *FEMS Microbiol Lett* 2004 Sep 15;238(2):353-8.
- [344] Blomberg B, Jureen R, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile DS, Urassa WK, et al. High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *J Clin Microbiol* 2005 Feb;43(2):745-9.
- [345] Gangoue-Pieboji J, Miriagou V, Vourli S, Tzelepi E, Ngassam P, Tzouveleki LS. Emergence of CTX-M-15-producing enterobacteria in Cameroon and characterization of a blaCTX-M-15-carrying element. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jan;49(1):441-3.
- [346] Naas T, Lezzar A, Bentchouala C, Smati F, Scheftel JM, Monteil H, et al. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Senftenberg* isolates producing CTX-M beta-lactamases from Constantine, Algeria. *J Antimicrob Chemother* 2005 Aug;56(2):439-40.
- [347] Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2009 Oct;34(4):340-2.
- [348] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. PER-6, an extended-spectrum beta-lactamase from *Aeromonas allosaccharophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Apr;54(4):1619-22.

- [349] Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 May;49(5):1708-13.
- [350] Perilli M, De SF, Mugnaioli C, Rossolini GM, Luzzaro F, Stefani S, et al. Spread of *Enterobacteriaceae* carrying the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene as a chromosomal insert: a report from Italy. *J Antimicrob Chemother* 2007 Feb;59(2):323-4.
- [351] Lee HW, Kang HY, Shin KS, Kim J. Multidrug-resistant *Providencia* isolates carrying blaPER-1, blaVIM-2, and armA. *J Microbiol* 2007 Jun;45(3):272-4.
- [352] Iabadene H, Dallenne C, Messai Y, Geneste D, Bakour R, Arlet G. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Sep;53(9):4043-4.
- [353] Poirel L, Bruderer T, Frei R, Bernabeu S, Graber P, Nordmann P. Multidrug-resistant *Providencia stuartii* expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1, originating in Kosovo. *J Antimicrob Chemother* 2008 Jun;61(6):1392-3.
- [354] Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G, et al. Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2002 Apr;40(4):1549-52.
- [355] Falcone M, Perilli M, Mezzatesta ML, Mancini C, Amicosante G, Stefani S, et al. Prolonged bacteraemia caused by VIM-1 metallo-beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis*: first report from Italy. *Clin Microbiol Infect* 2010 Feb;16(2):179-81.
- [356] Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2007 Jul;60(1):136-9.
- [357] Schneider I, Markovska R, Marteva-Proevska Y, Mitov I, Markova B, Bauernfeind A. Detection of CMY-99, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase, and VIM-1

- in *Proteus mirabilis* isolates in Bulgaria. Antimicrob Agents Chemother 2013 Oct 28.
- [358] Papagiannitsis CC, Miriagou V, Kotsakis SD, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Petinaki E, et al. Characterization of a transmissible plasmid encoding VEB-1 and VIM-1 in *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2012 Jul;56(7):4024-5.
- [359] Miriagou V, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Casals JB, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Detecting VIM-1 production in *Proteus mirabilis* by an imipenem-dipicolinic acid double disk synergy test. J Clin Microbiol 2010 Feb;48(2):667-8.
- [360] Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. J Clin Microbiol 2008 Sep;46(9):3080-3.
- [361] Hu YY, Cai JC, Zhang R, Zhou HW, Sun Q, Chen GX. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring blaKPC-2 and qnrD in a Chinese Hospital. Antimicrob Agents Chemother 2012 May;56(5):2278-82.
- [362] Cicek AC, uzgun AO, aral A, andalli C. Determination of a novel integron-located variant (bla) of Class D beta-lactamase in *Proteus mirabilis*. J Basic Microbiol 2013 Sep 11.
- [363] Bennett JW, Mende K, Herrera ML, Yu X, Lewis JS, Wickes BL, et al. Mechanisms of carbapenem resistance among a collection of *Enterobacteriaceae* clinical isolates in a Texas city. Diagn Microbiol Infect Dis 2010 Apr;66(4):445-8.
- [364] Wiczorek P, acha P, auschild T, stas A, losowska W, atajczak J, et al. The aac(6')Ib gene in *Proteus mirabilis* strains resistant to aminoglycosides. Folia Histochem Cytobiol 2008;46(4):531-3.
- [365] Vanhoof R, Nyssen HJ, Van BE, Hannecart-Pokorni E. Aminoglycoside resistance in Gram-negative blood isolates from various hospitals in Belgium and the Grand Duchy of Luxembourg. Aminoglycoside Resistance Study Group. J Antimicrob Chemother 1999 Oct;44(4):483-8.

- [366] Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Perrier Gros Claude JD, Timinouni M. Qnr and aac (6)-Ib-cr types quinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolated in Annaba, Algeria. *Pathol Biol (Paris)* 2011 Aug;59(4):e73-e78.
- [367] Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De MR, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007 Mar;59(3):459-64.
- [368] Naas T, Bentchouala C, Lima S, Lezzar A, Smati F, Scheftel JM, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* Senftenberg isolates from Algeria. *J Antimicrob Chemother* 2009 Oct;64(4):866-8.
- [369] Naas T, Bentchouala C, Cuzon G, Yaou S, Lezzar A, Smati F, et al. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype *Infantis* producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2011 Aug;38(2):135-9.
- [370] Bouzidi N, Aoun L, Dekhil M, Granier SA, Poirel L, Brisabois A, et al. Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene armA in non-Typhi *Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J Antimicrob Chemother* 2011 Sep;66(9):2180-1.
- [371] Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008 Sep;62 Suppl 1:i1-i9.
- [372] Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdani-Bouguessa N., Lounes S., Bakour R., et al. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother* 2008 Jul;62(1):133-6.
- [373] Baba Ahmed-Kazi TZ, Decre D, Genel N, Boucherit-Otmani Z, Arlet G, Drissi M. Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb Drug Resist* 2013 Jun;19(3):185-90.

- [374] Mahrouki S, Perilli M, Bourouis A, Chihi H, Ferjani M, Ben Moussa M, et al. Prevalence of quinolone resistance determinant qnrA6 among broad- and extended-spectrum beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* clinical isolates with sul1-type class 1 integron association in a Tunisian Hospital. *Scand J Infect Dis* 2013 Aug;45(8):600-5.
- [375] Visalli MA, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Feb;47(2):665-9.
- [376] Martiny D, Cremagnani P, Gaillard A, Miendje Deyi VY, Mascart G, Ebraert A, et al. Feasibility of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) networking in university hospitals in Brussels. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013 Nov 7.

ANNEXES

Annexe 1.

FICHE DE RECUEIL DES RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

ETAT CIVIL

NOM : PRENOM :

SEXE M F

DATE DE NAISSANCE :/...../.....

AGE :

HOPITAL :SERVICE :

MEDECIN TRAITANT :

ADRESSE :

PRESENTATION CLINIQUE

DATE D'HOSPITALISATION:/...../.....

MOTIF :

SYMPTOMES :

DATE DE PRELEVEMENT :/...../.....

TRAITEMENT ATB : Posologie...../jour Durée.....jours

GUERISON OUI NON

DECES OUI NON

Annexe 2.

Composition des milieux de cultures utilisés

1. Citrate de Simmons

Magnesium sulfate $MgSO_4$	0,2g
Ammonium dihydrogène phosphate $(NH_4) H_2PO_4$	1g
Phosphate dipotassium K_2HPO_4	1g
Citrate de Sodium ou acétate de sodium	2g
Chlorure de sodium (NaCl)	5g
Agar	15g
Bromothymol blue	0,08g

2. Gélose chocolat (ou gélose au sang cuit)

Peptone tryptique de caséine	7,5 g
Peptone pepsique de viande	7,5 g
Amidon de maïs	1,0 g
Hydrogénophosphate de potassium	4,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hémoglobine	10,0 g
Supplément glucosé, vitaminé type Polyvitex	1 ml
Agar	15,0 g
pH	7,2

3. Gélose Hektoen

Protéose-peptone	12,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	12,0 g
Saccharose	12,0 g
Salicine	2,0 g
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5 g
Sels biliaires	9,0 g
Fuchsine acide	0,1 g

Bleu de bromothymol	0,065 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Thiosulfate de sodium	5,0 g
Agar	13,0 g
pH	7,5

4. Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de boeuf	300,0 ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17,0 g
pH	7,4

5. Gélose Nutritive

Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g
pH	7,4

6. Mannitol-Mobilité-Nitrate

Hydrolysate tryptique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,4 mg
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
pH	7,6

7. Milieu Clark et Lubs

Peptone tryptique de viande	6g
Glucose	5g
K ₂ HPO ₄	5g
pH	7 ± 0,2 à 25°C

8. Trypticase-Soja (TSA)

Peptone trypsique de caséine	15,0 g
Peptone papainique de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g
pH	7,3

9. TSI

Peptone	15,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Peptone pepsique de viande	5,0 g
Glucose	1,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Rouge de phénol	0,024 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Sulfate de fer II (Pasteur)	0,2 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Agar	11,0 g
pH	7,5

10. Urée-tryptophane (Urée-Indole)

Urée	2,0 g
L-tryptophane	0,3 g
Ethanol à 0,95	1 ml
Rouge de phénol	2,5 mg
Chlorure de sodium	0,5 g
Dihydrogénophosphate de potassium	0,1 g
Hydrogénophosphate de potassium	0,1 g
pH	7

Annexe 3.

Tableau 36. Les caractères biochimiques des *PMP* (galerie classique).

Milieu	Ensemencement	Test	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. morganii</i>	<i>P. stuartii</i>
Gélose T.S.I	Ensemencement par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.	Lactose	-	-	-	-
		Glucose	+	+	+	+
		Gaz	+	+	V	-
		H ₂ S	+	+	-	-
Milieu mannitol-mobilité-nitrate	Ensemencement par piqûre centrale	Mannitol	-	-	-	-
		Mobilité	++	++	+	+
		Nitrate	+	+	+	+
Milieu au citrate de sodium	Ensemencement en stries serrées ou par inondation	Citrate de Simmons	V	V	-	+
Milieu urée-indole	Ensemencement avec quelques gouttes de la suspension bactérienne	Uréase	+++	+++	+++	V
		Indole	+	+	+	+
		TDA	+	+	+	+
Milieu de Clark et Lubs	Ensemencement avec quelques gouttes de la suspension bactérienne	RM	+	+	+	+
		VP	-	-	-	-

Annexe 4.

Fiche technique de la galerie API 20^E

TECHNIQUE :

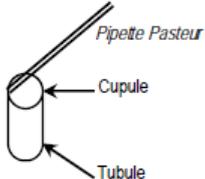
Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum

- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland) dans un tube d'eau distillée stérile.

Inoculation de la galerie

Remplir les tubules et les cupules des tests du type [CIT]		Remplissage des tubes :  Pipette Pasteur Cupule Tubule
Remplir les tubules des tests du type ADH et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l'anaérobiose.		
Remplir uniquement les tubules des tests restants		

Remarque : il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (GAZ+)

RESULTATS ET IDENTIFICATION :

- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées.
- Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : Test VP, TDA, IND, Nitrate réductase...
- Avec le tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau : chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité
- Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres

correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification.

Tableau 37. Tableau de lecture des résultats de la galerie API 20^E

Tests	Réactions/enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine decarboxylase		
ODC	Ornithine decarboxylase		
CIT	Citrate utilisation	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/bleu
H ₂ S	H ₂ S production	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urease	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane deaminase	TDA/immédiat	
		Jaune	Marron-rougeâtre
IND	Indole production	JAMES/immédiat	
		Incolore Vert-pâle/jaune	Rose
VP	Acetoin production	VP 1+ VP 2 / 10 min	
		Incolore	Rose/rouge
GEL	Gelatinase	Aucune diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose fermentation/oxidation	Bleu / bleu-vert	Jaune/ jaune gris
MAN	Mannitol fermentation/oxidation	Bleu / bleu-vert	Jaune
INO	Inositol fermentation/oxidation		
SOR	Sorbitol fermentation/oxidation		
RHA	Rhamnose fermentation/oxidation		
SAC	Sucrose fermentation/oxidation		
MEL	Melibiose fermentation/oxidation		
AMY	Amygdalin fermentation/oxidation		
ARA	Arabinose fermentation/oxidation		

Annexe 5.

Tableau 38. Les services hospitaliers

Groupe	Services
Services médicaux	Services de cardiologie Services de dermatologie Services d'endocrinologie Services de gastrologie Services d'hématologie Services de maladies infectieuses Services de médecine interne Services de neurologie Services de pneumo-physiologie Services de psychiatrie
Urgences médicales	Centre des brûlés Services de réanimation Services d'urgences médicales
Services chirurgicaux	Services de maternité poste-opératoire Services de médecine légale Services de neuro-chirurgie Services d'ORL Services d'orthopédie Services des urgences chirurgicales
Service de pédiatrie	Service de pédiatrie
Service des néonatal	Services de nursery

Annexe 6.

Marqueur de tailles de l'ADN

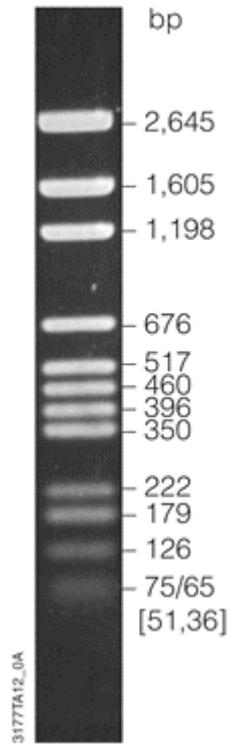


Figure 36. pGEM® DNA Markers. Load 5µl/lane.

<https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/benchtop-dna-markers/?activeTab=1>

Annexe 7.

Productions Scientifiques

1. Publications

Article 1. Leulmi Z., Kandouli C., Benlabed K., Lezzar A., Mihoubi I. Prevalence and evaluation of resistance to antibiotics of genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* isolates in University Hospital of Constantine, Algeria. International Journal of Advanced Research 2014; 2 (1): 220-227.

2. Publication en cours

Article 2. Leulmi Z., Kandouli C., Mihoubi I., Benlabed K., Lezzar A., Rolain J.M. First description of *bla_{OXA-24}*, *armA* Methyltransferase and *aac(6)-Ib-cr* producing *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* clinical isolates in Algeria.

3. Communications

1. Leulmi Z., Kandouli C., Mihoubi I., Benlabed K., Lezzar A., Rolain J.M. Fréquence et résistance aux antibiotiques des isolats de *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* uropathogènes isolés à l'hôpital universitaire de Constantine, Algérie. 6^{ème} Journée Internationale d'Infectiologie de Sétif (JIIS). 18 Avril 2013, Faculté de Médecine, Université de Sétif – Algérie.

2. Leulmi Z., Kandouli C., Mihoubi I., Benlabed K., Lezzar A., Rolain J.M. Les infections nosocomiales à *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* isolés à l'hôpital universitaire de Constantine et leurs profils de sensibilité aux antibiotiques. 32^{ème} journées scientifiques du CHU Dr Benbadis Constantine, 5 – 6 juin 2013, Faculté de Médecine, Constantine – Algérie.



ISSN NO. 2320-5407

Journal homepage: <http://www.journalijar.com>

INTERNATIONAL JOURNAL
OF ADVANCED RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

Prevalence and evaluation of resistance to antibiotics of genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* isolates in University Hospital of Constantine, Algeria

Zineb Leulmi^{*1,2}, Chouaib Kandouli³, Kaddour Benlabed¹, Abdeslam Lezzar¹ and Ilhem Mihoubi⁴

1. Laboratory of Clinical Bacteriology, University Hospital of Constantine, Algeria.

2. Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences. University Constantine 1, Algeria

3. Laboratory of Biology and Environment, Faculty of Natural and Life Sciences. University Constantine 1, Algeria.

4. Laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity

Manuscript Info

Manuscript History:

Received: 22 November 2013

Final Accepted: 25 December 2013

Published Online: January 2014

Key words:

Antimicrobial susceptibility, multidrug resistance, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*.

*Corresponding Author

Zineb Leulmi

Abstract

The three genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* (*PMP*) are opportunistic microorganisms which cause serious hospital and community infections. However, in many laboratories in developing countries, differentiation of these genera into species is not generally done during bacteriological diagnosis due to high cost and special skills involved. This study aimed at determining the occurrence and antimicrobial susceptibility of genera *PMP* isolated from different clinical samples in Constantine, Algeria. 17 834 clinical samples were collected in the Clinical Microbiology Laboratory of Benbadis University Hospital in Constantine, during the year 2011. The isolates were identified to the species level using conventional biochemical tests and the identification was confirmed on the basis of the results of Analytical Profile Index API20E tests. Antimicrobial susceptibility of isolates was determined by the disk-diffusion method on Mueller-Hinton Agar. 4173 were positive (23.40% of total samples). Four *PMP* species were recovered from 304 of 4173 positive result giving 7.28 % prevalence of *PMP* infections mainly isolates from in-patients (78.95%);

Proteus mirabilis was the commonest (70.06 %), followed by *Proteus vulgaris* (15.13 %). *Morganella morganii* accounted for (10.19 %) and *Providencia stuartii* (4.60 %). Strains of *PMP* most commonly isolated from pus (47.04 %) followed by urine samples. All of *PMP* strains isolated were susceptible to carbapenems. We reported that strains were generally susceptible to Cefoxitin, Cefotaxime, Imipenem, Amikacin, Ciprofloxacin. We observed a high percentage of *PMP* strains resistant to Amoxicillin, Nalidixic acid, Triméthoprim/ sulfamethoxazol. However, *M. morganii* and *P. stuartii* isolates exhibited a high resistance to Ticarcillin, Gentamicin, Chloramphénicol. More than 61% of all strains were found to be multiple drugs resistant. Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL) were produced by 10.33 - 16.13 % of *PMP* strains.

Copy Right, IJAR, 2014.. All rights reserved.

Introduction

The three genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* (*PMP*) belongs to the *Enterobacteriaceae* family comprising approximately a total of ten species (Manos and Belas, 2006). The proximity of these three genera is observed on phenotypic studies and also genetically, as shown in phylogenetic trees constructed on the basis of RNA sequences and gene *gyrB* (Freney et al., 2007; Dauga, 2002). Due to close similarity of *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* rods, all three genera were placed in the tribe *Proteeae*, however, the tribe designation is not often used (Rózalski and Staczek, 2009). Members of these three genera are components of the normal bacterial flora of the intestinal

tracts of humans and animals and are widespread in the environment. Some species belonging to these genera have been recognized as opportunistic pathogens, causing primary and secondary infections (O'Hara et al., 2000). Interest in the species comprised in these genera has occurred mainly from a clinical perspective, as they include a number of significant human pathogens. These pathogens have a diverse mode of transmission, and hence can cause infection in different anatomical sites of the body. Some of the sources of transmission are soil, contaminated water, food, equipment, intravenous solutions, the hands of patients and healthcare personnel (Feglo et al., 2010). Most infections are associated with prolonged hospitalization and in the case of *Proteus* and *Morganella* spp., associated with colonization of indwelling catheters and urinary tract infections (Manos and Belas, 2006). This study seeks to evaluate the frequency of isolation and antibiotic susceptibility of *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* recovered from infections in patients hospitalized and outpatients in the University Hospital of Constantine in Algeria.

Materials and Methods

Isolation site

The study was undertaken in the Laboratory of clinical bacteriology at the University Hospital of Constantine, Algeria, during the year 2011. A large variety of clinical samples were issued: urine, purulent material from wounds or abscesses, blood or aspirates (of joint fluid, pleural fluid, ascitic fluid and pus) and other diverse material (such as catheter) collected from 17834 patients suspected of bacterial infection. Demographic data (such as sex, in-patient and out-patient status) of the patients were recorded prior to sample collection.

Culture and Identification

All samples collected were aseptically inoculated on the various media included: Blood, Chocolate, Nutrient and Hektoen agars, and incubated at 37°C for 24 hours. However, suspected *PMP* colonies were isolated from simple media (Nutrient or Hektoen agars)

The morphological characteristics of the colonies including sizes, shapes, ability to swarm, ability or inability to ferment lactose, odor and microscopic features of the cells were recorded. Identification of clinical isolates was carried out through biochemical tests according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt and Williams, 1989). The identification of selected *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* colonies was confirmed by Analytical Profile Index; API20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)

Antimicrobial susceptibility test

Susceptibility test was conducted by the disc diffusion method on Mueller-Hinton. The different antimicrobial agents used and their disc concentration were : amoxicillin (25 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), ticarcillin (75 µg), cefazolin (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefotaxime (30 µg), imipenem (10 µg), gentamicin (15 µg (10 UI), amikacin (30 µg), colistin (50 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), trimethoprim/sulfamethoxazol (1,25/23,75 µg), chloramphenicol (30 µg). Plates were incubated for 24 h at 37°C after which the inhibition zones were measured. The results were interpreted according to the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2007). The isolates that showed resistance to 3 or more antibacterial agents from different classes were regarded as MDR and were included in this study.

Detection of β- Lactamases

ESBL producing isolates were detected by double disc synergy test including amoxicillin/clavulanic acid (AMC) containing disc placed in the center, 30 mm distant from-cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CRO) or ceftazidime (CAZ) containing discs. Production of ESBL was indicated by the synergy between the CAZ, CTX and CRO and AMX/CLA disc.

Results

Proteus, *Morganella* and *Providencia* species isolated

Among the 17834 samples collected, 4173 were positive and represented 23.39% of total samples, 1585 were contaminated and represented 8.88% of total samples. The remaining samples were negative and represented 67.86 % which corresponded to 12076 samples. Four species were recovered from 304 of the 4173 positive results, rendering a prevalence rate of 7.28 %. *PMP* were isolated from nearly 1.7% of total samples collected / year. *Proteus mirabilis* was the most prevalent (70.06 %), followed by *Proteus vulgaris* (15.13 %). *Morganella morganii*

accounted for (10.19 %) and *Providencia stuartii* (4.60 %) of the *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* isolates (Figure 1).

The PMP isolates were obtained from 14 different specimens as indicated on* (Table 1) with the following percentage representations: pus (47.04 %), urine (31.91 %), blood (5.92 %), sonde (5.92 %), tracheal (2.63 %), catheter (1.64 %), Ascitic fluid (0.98 %), peritoneal fluid (0.98 %), pleural fluid (0.65 %), vaginal sample (0.65 %), gastric fluid (0.33 %), cerebrospinal fluid (0.33 %), mammary flow (0.65 %) and umbilical cord (0.33 %). *P. mirabilis* was the most frequent species isolated in all the specimens with the exception of catheter, from which there were recovered 2 *P. mirabilis* isolates respect 3 isolates of *P. stuartii*, and cerebrospinal fluid from which it was only isolated 1 *P. vulgaris*. *P. mirabilis* was isolated from pus (46.01%), urine (33.33%), sonde (6.10%) and blood (5.63%). *P. vulgaris* was highly isolated from pus (67.39%) followed by urine (17.39). *M. morganii* was more frequent in urine (48.39%) and *P. stuartii* in pus (35.71%).

There were a total of 240 samples from in-patients (78.95%) and 64 out-patients (21.05%) as shown in Table 1 below. A total of 161 *P. mirabilis* (75.59 %) were isolated from in-patients whereas 52 (24.41 %) were from out-patients. On the other hand *P. vulgaris* was isolated from in-patients in 42 (91.30 %) cases and 4 (8.70 %) from out-patients. Also, 24 (77.42 %) *M. morganii* were isolated from in-patients and 7 (22.58%) from out-patients. Finally, all but 1 *P. stuartii* isolates were recovered from in-patients. The most frequent positive sample from in patients corresponded to pus (64.71 %). Urine samples corresponded to 48% from in patients and 49% from outpatients.

There were a total of 168 (55.26 %) isolates recovered from males and 136 (44.73 %) from females. As presented in (Table 1), *P. mirabilis* infection was detected among 109 males (51.17%) and 104 females (48.83%). *P. vulgaris*, on the other hand, was isolated from 31 males (67.39 %) and 15 females (32.61%). *M. morganii* was isolated from 17 males (54.84 %) and 14 females (45.16 %), and finally, *P. stuartii* was isolated from 11 males (78.57 %) and 3 females (21.43 %).

Antimicrobial susceptibility of *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* isolates

A review of the antimicrobial resistance profile of isolates from the different clinical specimens showed that cefoxitin, cefotaxime, imipenem, amikacin, ciprofloxacin were the most active antibiotics. Antibiotics with the lowest activities on all four species were amoxicillin, nalidixic acid, trimethoprim + sulfamethoxazol (resistance 42.62 % - 100 %). However, *M. morganii* and *P. stuartii* isolates exhibited a high resistance to ticarcillin, gentamicin, chloramphenicol. More than 61% of all isolates were found to be multiple drug resistant (resistant to at least 3 antibiotics). However, 10.33 - 16.13 % produced ESBL. There was no significant difference in the ESBL production by the various species (table 2).

Figure 1. Distribution of the various *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* species isolated

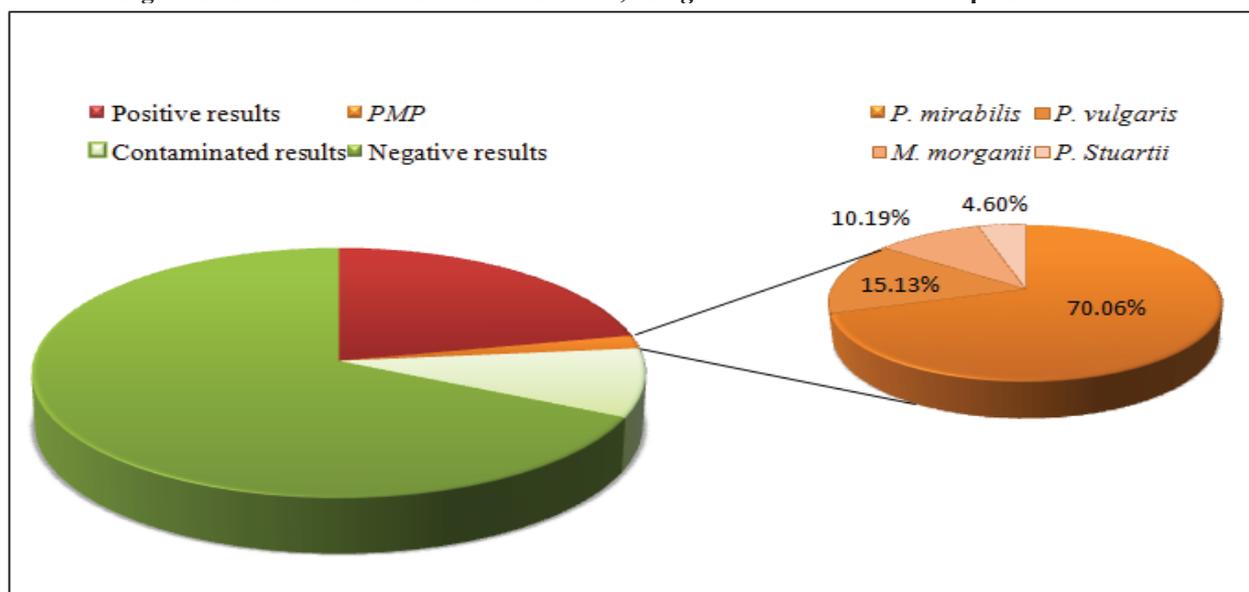


Table 1. *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* species isolated from various specimens in relation to in-patients and out-patients

Specimens	No	Species																			
		<i>P. mirabilis</i>				<i>P. vulgaris</i>				<i>M. morganii</i>				<i>P. stuartii</i>							
		In-patient ♂	In-patient ♀	Out-patient ♂	Out-patient ♀	Total	In-patient ♂	In-patient ♀	Out-patient ♂	Out-patient ♀	Total	In-patient ♂	In-patient ♀	Out-patient ♂	Out-patient ♀	Total					
Pus	143	56	33	4	5	98	20	9	0	2	31	8	1	0	0	9	4	1	0	0	5
Urine	97	10	22	17	22	71	5	1	2	0	8	2	6	3	4	15	2	0	0	1	3
Blood	18	5	7	0	0	12	3	1	0	0	4	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Sonde	18	8	5	0	0	13	1	0	0	0	1	2	2	0	0	4	0	0	0	0	0
Tracheal	8	3	1	0	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1	1	0	0	2
Catheter	5	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
Ascitic fluid	3	0	1	1	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peritoneal fluid	3	2	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pleural fluid	2	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vaginal sample	2	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mammary Flow	2	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastric fluid	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cerebrospinal fluid	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Umbilical cord	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	304	87	74	22	30	213	29	13	2	2	46	14	10	3	4	31	11	2	0	1	14
		161		52			42		4			24		7			13				

Table 2. Percentage of antibiotic resistance of *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* isolates

	AMX	AMC	TIC	CZO	FOX	CTX	IMP	GEN	AMK	COL	NAL	CIP	SXT	CHL	MDR	ESBL
<i>P. mirabilis</i>	60.80	32.87	54.17	39.41	3.29	18.46	0	20.90	17.53	*	42.62	24.86	55.74	44.19	61.03	10.33
<i>P. vulgaris</i>	*	41.38	35	*	2.17	19.05	0	32.5	12.82	*	45.95	26.67	60.53	34.29	67.39	10.87
<i>M. morganii</i>	*	*	52	*	52	37.93	0	50	23.08	*	62.96	36	72	64.29	87.09	16.13
<i>P. stuartii</i>	*	*	80	*	33.33	54.55	0	72.73	75	*	45.45	27.27	100	88.89	92.86	14.29

AMX: amoxicillin; AMC : amoxicillin + clavulanic acid; TIC: ticarcillin; CZO: ceftazolin; FOX : cefoxitin; CTX : cefotaxime; IMP : imipenem; GEN : gentamicin; AMK : amikacin; COL : colistin; NAL : nalidixic acid; CIP : ciprofloxacin; SXT : trimethoprim + sulfamethoxazol; CHL : chloramphenicol; MDR: Multi-drug resistance; ESBL: Extended-spectrum beta-lactamase. * : Natural Resistance

Discussion

Species identification is critical in the diagnosis and treatment of people infected with *PMP*. It is also required in disease prevention, patient management, and surveillance of infection. While antimicrobial resistance surveys have revealed that members of the *PMP* are relatively frequent among clinical isolates, and a number of series have investigated specific subsets of infections caused by these organisms (Mahamat et al., 2006; Zalas-Wiecek et al., 2012; Shima et al., 2012), few studies have focused on the *PMP* as a whole (Kim et al., 2003). This study represents the first population-based description of *PMP* group in Algeria, and provides new information on the distribution of clinical isolates at the University Hospital of Constantine, Algeria. *PMP* were isolated from nearly 1.7% of samples collected in this study, confirming that these organisms are relatively frequent. Four *PMP* species (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani* and *P. stuartii*) were identified to be responsible for causing infections in various anatomical sites. *P. mirabilis* was the most frequent species isolated (70.06 %), hence responsible for the majority of *PMP* infections and therefore supported by the fact that it is the most virulent of all the *PMP* (O'Hara et al., 2000; Coker et al., 2000), and hence the commonest etiologic agent of both community and hospital acquired infections. This can be explained by the high carrier rate (25%) in the human digestive tract (Farmer, 1999). The intestines are although the major reservoir of these bacteria in humans, resulting from auto-infection or transmission from patient to patient in hospitals (Farmer, 1999). The findings of our study are in agreement with those of some previous studies in Germany (Muller, 1986), Trinidad (Orrett, 1999), England, Wales, Northern Ireland (CDR Weekly, 2006) and Ghana (Feglo et al., 2010). However, the study of Kim et al. in Korea showed that *M. morgani* are the most common species isolated (61 cases), followed by *P. mirabilis* and *P. vulgaris*. However, this study was focused solely on isolates from bacteraemia (Kim et al., 2003). Pus recorded the highest percentage of *Proteus* isolates (46.0%) followed by urine samples (33.33%) and this confirmed the findings of Newman et al. (Newman et al., 2006) and Feglo et al. (Feglo et al., 2010) in Ghana and Yah et al. (Yah et al., 2007) in Nigeria. *Proteus* is therefore a common cause of wound infections in Algeria. Our findings are, however, in contrast with those of Reslinski et al. (Reslinski et al., 2005) and Orrett (Orrett, 1999) from Europe and Asia which showed *Proteus* species to be more commonly encountered in urine than in other clinical specimens*.

PMP infections were also common among the in-patients (78.95%) as compared to out-patients (21.05%). This trend can be explained by the fact that *PMP* behave as opportunistic pathogens and are therefore involved in infectious diseases, especially among individuals hospitalized, immunocompromised, paraplegic or with urinary tract abnormalities (Mahamat et al., 2006; O'Hara et al., 2000). In the United States *P. mirabilis* accounts for approximately 3% of nosocomial infections (Centers for Disease Control and Prevention, 1996). There was no significant difference ($p > 0.05$) between the males and females infected with *PMP* in this study.

The *PMP* species displayed high antimicrobial resistance rates. similar to previous reports in Algeria (Rahal, 2008). The pattern of resistance to antibiotics of *PMP* strains seems to be correlated to some extent with their classification into four species.

More than 61% of the isolates were found to be multiple drug resistant. The high antibiotic resistance of *PMP* may be an indication of the resistance levels among the *Enterobacteriaceae* since indiscriminate consumption of antibiotics provides selective pressure, leading to a higher prevalence of resistant bacteria (Levy, 1999), which is very common in developing countries like Algeria. Not only, these species are potential causes of infections but also potential reservoirs of resistance genes that could be transferred to other bacterial pathogens. The frequency of ESBL-producing strains is comparable to that reported by Rahal et al. (Rahal, 2008) in Algeria. The high level of β -lactamase producing isolates and multi-drug resistant isolates denotes an increase in the resistance menace. This general situation is the result of selection pressure due to extensive use of β -lactam antibiotics. In addition, the acquired resistance due to their plasmid determinism has great power to spread.

Conclusion

Resistance to antibiotics is an increasingly common problem in both veterinary and human medicine, and its management is a subject of urgent debate. Species identification and a better study of the epidemiology of antimicrobial resistance will improve the management and control of infections and the therapeutic management of patients while reducing the prescription of large spectrum antibiotics. This can only be done at the expense of better monitoring. These practices are generally absent in most of our hospitals, mainly due to the high costs involved. Therefore this study is a step towards the generation of national data on the prevalence of antimicrobial resistant pathogens in Algeria.

References

CDR Weekly, (2006): *Proteus spp, Morganella morgani, and Providencia spp bacteraemia, England, Wales, and Northern Ireland: 2000 to 2005*. In Health Protection Agency (Ed.): *the Communicable Disease Report Weekly*.

- Centers for Disease Control and Prevention, (1996): National nosocomial infections surveillance (NNIS) report, data summary October 1986–April 1996. *In Am. J. Infect. Control.*, p. 381
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2007): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement, pp. 1-182.
- Coker, C., Poore, C. A., Li, X. and Mobley, H. L., (2000): Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes.Infect.*, 2: 1497-1505.
- Dauga, C., (2002): Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 52: 531-547.
- Farmer, J. J. I., (1999): *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In Murray PR and al. (Eds.) *Manual of clinical microbiology*, Washington: Washington DC., pp. 442-458.
- Feglo, P. K., Gbedema, S. Y., Quay, S. N. A., Adu-Sarkodie, Y. and Opoku-Okrah, C., (2010): Occurrence, species distribution and antibiotic resistance of *Proteus* isolates: A case study at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. *Int.J.Pharm.Sci.Res.*, 1: 347-352.
- Freney, J., Croze, M. and Monnet, D., (2007): *Proteaeae*. In Lacassagne A (Ed.) *Précis de la Bactériologie Clinique*, pp. 1037-1050.
- Holt, J. G. and Williams, S. T., (1989): *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore USA.
- Kim, B. N., Kim, N. J., Kim, M. N., Kim, Y. S., Woo, J. H. and Ryu, J., (2003): Bacteraemia due to tribe *Proteaeae*: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). *Scand.J.Infect.Dis.*, 35: 98-103.
- Levy, S. B., (1999): Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In Ciba Found.Symp. (Ed.), pp. 1-14.
- Mahamat, A., Lavigne, J. P., Bouziges, N., Daures, J. P. and Sotto, A., (2006): Antimicrobial susceptibility of *Proteus mirabilis* urinary tract isolates from 1999 to 2005 at Nimes University Hospital. *Pathol.Biol.(Paris)*, 54: 456-461.
- Manos, J. and Belas, R., (2006): The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (Eds.) *The Prokaryotes*. pp. 245-269.
- Muller, H. E., (1986): Occurrence and pathogenic role of *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria in human feces. *J.Clin.Microbiol.*, 23: 404-405.
- Newman, M. J., Frimpong, E., Asamoah-Adu, A. and Sampene-Donkor, E., (2006): Resistance to antimicrobial drugs in Ghana. In : The Ghanaian-Dutch Collaboration for Health Research and Development.
- O'Hara, C. M., Brenner, F. W. and Miller, J. M., (2000): Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin.Microbiol.Rev.*, 13: 534-546.
- Orrett, F. A., (1999): Prevalence of *Proteus* species in urinary tract infections in a regional hospital in Trinidad. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.(Taipei)*, 62: 438-442.
- Rahal, K., (2008): Surveillance of bacterial resistance to antibiotics in Algeria. In *Ministry of Health, P. a. H. R.* (Ed.): the World Health Organization.
- Reslinski, A., Gospodarek, E. and Mikucka, A., (2005): Prevalence of multidrug-resistant *Proteus spp.* strains in clinical specimens and their susceptibility to antibiotics. *Med.Dosw.Mikrobiol.*, 57: 175-184.

Rózalski, A. and Staczek, P., (2009): *Proteus*. In Liu D (Ed.) *Molecular Detection of Foodborne Pathogens* (pp. 217-230) United States of America: Taylor and Francis Group, LLC.

Shima, A., Hinenoya, A., Asakura, M., Nagita, A. and Yamasaki, S., (2012): Prevalence of *Providencia* strains among children with diarrhea in Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.*, 65: 545-547.

Yah, S. C., Eghafona, N. O., Ornu, S. and Abouo, A. M., (2007): Widespread plasmid resistance genes among *Proteus* species in diabetic wounds of patients in the Ahmadu Bello university teaching hospital (ABUTH) Zaria. *Afr.J.Biotechnol.*, 6: 1757-1762.

Zalas-Wiecek, P., Gospodarek, E. and Wroblewska, J., (2012): Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Morganella morganii* strains isolated from clinical samples. *Przegl.Epidemiol.*, 66: 13-18.

RESUMES

Abstract

Proteus, *Morganella* and *Providencia* (*PMP*) are a major cause of bacterial infections causing primary and secondary infections. Epidemiological data on *PMP* isolates in clinical specimens and their antimicrobial sensitivity testing is important to help clinicians in the empirical selection of medications. Here we performed characterization of *PMP* clinical isolates using the API 20E system and Bruker MALDI Biotyper 2.0 (MALDI-TOF/MS) platforms for microbial identification. Diagnostic accuracy was determined by independent comparison of each method to phylogenetic analysis based on the 16S rDNA gene sequencing. This study was designed also to evaluate the emergence of multidrug resistance and the prevalence of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), carbapenemases, aminoglycoside-modifying enzymes and resistance to fluoroquinolones among 110 *PMP* strains that were isolated from a large variety of clinical specimens at University Hospital of Constantine in Algeria. The Api 20E system correctly identified 92.59% to the species level, while, the Bruker Biotyper correctly identified 99.05% isolates to the species level, in comparison with the 16S rDNA gene sequencing. MALDI-TOF MS identifications became concordant with 16S rDNA gene results for all strains except for one strain identified correctly to the genus level only. Antibiotic susceptibility testing was performed on all *PMP* clinical isolates, and presence of antibiotic resistance genes was screened for by PCR amplification and sequencing. 65.45 % of the strains (72 isolates) were positive for different antibiotic resistance encoding genes: *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{SHV-11}, *aadA1*, *aadA2*, *armA*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-I*, and forming different profiles. Moreover, the *bla*_{OXA-24} gene was detected in the imipenem-resistant strain. In this study, we found for the first time in Algeria a multidrug resistant *P. mirabilis* isolates harboring *bla*_{OXA-24}, *armA* 16S rDNA methylase and *aac(6)-Ib-cr* gene.

Keywords: *Proteus*, *Morganella* and *Providencia*, Identification, MALDI-TOF Mass Spectrometry, resistance to antibiotics, PCR.

المخلص

تعتبر أجناس بروتوتوس، مورغانيلة وبروفيدنسيا (*PMP*) سببا رئيسيا للعدوى البكتيرية مسببة العدوى الأولية والثانوية. تساعد البيانات الوبائية عن سلالات *PMP* في العينات المرضية واختبارات حساسيتها للمضادات الحيوية، بشكل مهم ، الأطباء في اختيار الأدوية الملائمة. في هذه الدراسة قمنا بتوصيف وتحديد العزلات السريرية للـ *PMP* باستخدام نظام API 20E ومطياف الكتلة MALDI-TOF (Bruker MALDI Biotyper 2.0). وقد تم تحديد دقة وقدرة التشخيص باستعمال كل نظام بعد مقارنتهما كل على حدا مع طريقة التحليل الفيلوجيني على أساس الترميط الجزئي للجين *ADNr 16S*. وقد تم التطرق في هذه الدراسة أيضا إلى تقييم ظهور المقاومة المتعددة للأدوية وانتشار إنزيمات β -lactamases ذات الطيف الممتد (BLSE)، الـ carbapenemases، الإنزيمات المعدلة للأمينوغليكوزيد (AME) و الإنزيمات المقاومة للفليوروكينولونات عند 110 سلالة من *PMP* التي تم عزلها من مجموعة كبيرة ومتنوعة من العينات السريرية في مستشفى جامعة قسنطينة في الجزائر. 92.59٪ من العزلات تم تصنيفها بشكل صحيح من ناحية النوع باستعمال نظام API 20، في حين صنف مطياف الكتلة 99.05٪ من العزلات من ناحية النوع بالمقارنة مع طريقة الترميط الجزئي للجين *ADNr 16S*. وبالتالي فإن التصنيف بالـ MALDI-TOF MS متطابق مع نتائج الترميط الجزئي للجين *ADNr 16S* لجميع السلالات باستثناء سلالة واحدة حيث حددت بشكل صحيح من ناحية الجنس فقط. أجريت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية على جميع العزلات السريرية للـ *PMP*، وكذا تم فحص وجود جينات المقاومة للمضادات الحيوية بعد تضخيمها عن طريق PCR و الترميط الجزئي. 65.45٪ من السلالات المدروسة أظهرت قدرتها على إنتاج مختلف الإنزيمات المقاومة للمضادات الحيوية وحملها لمختلف الجينات المشفرة لهذه الإنزيمات مشكلة ملامح مختلفة: *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-2}*, *bla_{PER-1}*, *bla_{SHV-11}*, *aadA1*, *aadA2*, *armA*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-I* علاوة على ذلك تم الكشف عن الجين *bla_{OXA-24}* في سلالة مقاومة للإمبيينام (imipénème).

في هذه الدراسة اكتشفنا لأول مرة في الجزائر سلالات من نوع *P.mirabilis* ذات مقاومة متعددة للأدوية تحمل المورثات التالية: *bla_{OXA-24}*, *armA* 16S rRNA methylase و *aac(6')-Ib-cr*.

الكلمات المفتاحية: *Providencia* و *Morganella*, *Proteus*، التحديد السريع، الطيف الكتلي-MALDI

TOF، المقاومة للمضادات الحيوية، PCR.

LEULMI Zineb Ep. KANDOULI

Date de soutenance : 05 / 03 / 2015

Thème : *Les Proteus incriminés dans les infections communautaires et hospitalières: étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques*

Nature du diplôme : Doctorat 3ème Cycle LMD

Domaine: Sciences de la vie

Mention : Microbiologie

Option : Biotechnologie Microbienne, Génome et Environnement

Résumé :

Proteus, Morganella et Providencia (PMP) sont une cause majeure d'infections bactériennes causant des infections primaires et secondaires. Les données épidémiologiques sur les isolats de *PMP* dans les échantillons cliniques et la recherche de la sensibilité aux antibiotiques sont importantes pour aider les cliniciens dans le choix empirique des antibiotiques. Nous avons réalisé, dans ce travail, l'isolement et l'identification des isolats cliniques de *PMP* en utilisant le système API 20E et la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker MALDI Biotyper 2.0). La précision des diagnostics a été déterminée après comparaison indépendante de chaque procédé à une analyse phylogénétique basée sur le séquençage du gène de l'ADNr 16S. Cette étude a été réalisée, également, pour évaluer l'émergence de la multirésistance (prévalence de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), de carbapénémases, des enzymes-modifiant les aminosides (AME) et des enzymes de résistance aux fluoroquinolones) chez 110 souches de *PMP* isolées à partir d'une grande variété d'échantillons cliniques à l'hôpital universitaire de Constantine en Algérie. Le système Api 20E a correctement identifié 92,59% des isolats au niveau de l'espèce, alors que la spectrométrie de masse a correctement identifié 99,05%, en comparaison avec le séquençage du gène de l'ADNr 16S. L'identification avec la MALDI-TOF MS est concordante avec les résultats du séquençage de gène d'ADNr 16S pour toutes les souches à l'exception d'une seule souche identifiée correctement au niveau du genre seulement. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été effectués sur tous les isolats cliniques de *PMP*, et la présence de gènes de résistance a été étudiée après amplification par PCR et séquençage. Près de 65,45% (72 souches) étaient positives pour différents gènes codant au moins pour une résistance aux antibiotiques: *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-2}*, *bla_{PER-1}*, *bla_{SHV-11}*, *aadA1*, *aadA2*, *armA*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-I*, formant différents profils. En outre, le gène *bla_{OXA-24}* a été détecté chez la souche résistante à l'imipénème. Dans cette étude, nous avons détecté pour la première fois en Algérie une souche de *P. mirabilis* multirésistante hébergeant les gènes *bla_{OXA-24}*, *armA* 16S rDNA méthylase et *aac(6')-Ib-cr*.

Mots clés : *Proteus, Morganella et Providencia*, Identification, Spectrométrie de masse MALDI-TOF, Résistance aux antibiotiques, PCR.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de microbiologie CHUC.

Président :	Mr. BOULAHROUF A.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Rapporteur :	Mme. MIHOUBI I.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Co-rapporteur:	Mr. BENLABED K.	Pr. Univ. Rabah Bitat de Constantine
Examineurs :	Mr. KITOUNI M.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
	Mr. KHELIFA F.	M.C. Univ. Rabah Bitat de Constantine