

***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTRICES DE
BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI (BLSE)
ISOLEES DANS LES HOPITAUX DE LA VILLE DE
ANNABA, ALGERIE**

**Farah Abid¹, Boutefnouchet Nafissa*¹,
Dekhil Mazouz², Bouzerna Nouredine¹**

¹*Faculté des Sciences, Département de Biochimie,
Université Badji Mokhtar, BP 12 El-Hadjar, Annaba (23200), Algérie.*

²*Faculté de Médecine, Département de Pharmacie,
Université Badji Mokhtar, BP 205 Zaafrania, Annaba (23200) et CHU
Dorban, Annaba, Algérie.*

*Corresponding author: boutefnaf@yahoo.fr, Tél: 038 876567; Fax: 038 86 85 10

Received: 17/10/2006

Accepted after revision: 15/02/2007

Abstract: The problem of antibiotic resistance is strictly considered a hospital one and reserved to bacteria responsible of nosocomial infections. During the last years, several investigations have shown the increasing role of *Klebsiella pneumoniae* in the intra-hospital infections. In this work, we investigate the presence of this species at hospitalized patients and within their environment in order to estimate the relationships between the two reservoirs and evaluate the resistance to antibiotics of this opportunist pathogen.

Keywords: *antibiotics resistance, hospital environment, Klebsiella pneumoniae BLSE +, hospital infections.*

Résumé: Le problème de la résistance aux antibiotiques est considéré comme strictement hospitalier réservé aux bactéries responsables d'infections nosocomiales. Au cours de ces dernières années plusieurs travaux ont montré le rôle croissant que jouait l'espèce *Klebsiella pneumoniae* dans les infections intra hospitalières.

Dans notre travail nous nous sommes fixés de rechercher des souches de *Klebsiella pneumoniae* chez des patients hospitalisés et dans leur environnement afin d'estimer la relation entre les deux réservoirs et évaluer l'état de résistance aux antibiotiques de ce pathogène opportuniste.

Mots-clés: *environnement hospitalier, infections intra hospitalière, Klebsiella pneumoniae, résistance aux antibiotiques.*

INTRODUCTION

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui appartient au genre *klebsiella* qui fait partie du groupe K.E.S. (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) doté d'une grande importance dans l'hospitalisme infectieux [1, 2].

La taxonomie du genre *Klebsiella* est encore discutée [3], car de nouvelles espèces sont incluses dans le genre sur des arguments phénotypiques sans réévaluation globale de la position taxonomique du genre parmi les entérobactéries ni des différentes espèces entre elles [4, 5].

Le genre *klebsiella* comporte actuellement cinq espèces *K. pneumoniae* comportant 3 sous espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozanae* et *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ; *klebsiella oxytoca*, *k. ornithinolytica*; *K. terrigena*; *K. planticola* [2, 3, 6 – 8].

Quelques souches de cette espèce sont naturellement résistantes aux pénicillines (amoxicilline, ampicilline, ticarcilline). La résistance à l'imipénème a été décrite chez des isolats cliniques de souche de *K. pneumoniae*, ainsi qu'une résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases.

Le développement et la fréquence des bactéries résistantes parmi les espèces communément responsables d'infections nosocomiales a eu pour conséquence une consommation accrue à certains antibiotiques, plus précisément les céphalosporines entraînant ainsi une escalade de résistance. C'est ainsi que l'utilisation des céphalosporines de troisième génération a permis de développer la résistance enzymatique des entérobactéries par production de bêta-lactamases à spectre étendue (BLSE), la production d'une telle enzyme permet à la bactérie de résister à toutes les bêta-lactamines excepté les cephamycines (Cefoxitine et imipénème) [9].

Dans ce travail nous avons recherché des souches de *K. pneumoniae* chez des patients hospitalisés et dans leur environnement afin d'estimer la relation entre les deux réservoirs, et détecter parmi celles-ci les souches productrices de BLSE. Nous avons aussi étudié le comportement de l'ensemble des souches vis-à-vis des antibiotiques testés pour les entérobactéries afin d'évaluer l'état de résistance de ce pathogène opportuniste chef de file des bacilles à Gram négatif responsables d'infections nosocomiales.

MATERIEL ET METHODES

Sur une période de 13 mois, du mois de mai de l'année 2003 au mois d'avril de l'année 2004, une enquête multicentrique a été menée au niveau des différents services des hôpitaux de la ville de Annaba en Algérie (hôpital Dorban, hôpital Ibn Rochd et hôpital Ibn Sina), 500 prélèvements ont été effectués ; ils ont ciblé dans un premier temps les malades hospitalisés depuis au moins trois jours suspectés d'avoir contractés une infection nosocomiale (prélèvements d'origine pathologique), puis dans un deuxième temps l'environnement hospitalier de ces mêmes malades (prélèvements de l'environnement hospitalier), des informations concernant chaque prélèvement effectué ont été recueillies de manière prospective: type de service ou le malade a été hospitalisé, type de prélèvement, l'âge et le sexe du malade, les prélèvements d'origine pathologique proviennent de divers produits pathologiques (sang, pus, urines, sécrétions respiratoires, sécrétions vaginales et liquide céphalorachidien), les prélèvements de l'environnement hospitalier ont ciblé différents sites : l'environnement proche du malade (mobilier, drap, surface inerte, dispositifs médicaux, antiseptiques, mains et blouses du personnel soignant).

L'isolement a été effectué sur les milieux les plus utilisés pour l'isolement des entérobactéries (milieu Mac Conkey et milieu Hektoen). L'identification biochimique a été réalisée en utilisant le système API20E. La sensibilité des souches de *K. pneumoniae* isolées a été testée selon la méthode de diffusion en milieu solide (Muëller-Hinton) selon la N.C.C.L.S. (National Committee For Clinical Laboratory Standard), les antibiotiques testés étaient les suivants: amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline, cefazoline, cefotaxime, imipénème, gentamicine, amikacine, chloramphenicol, nitrofurantoïne, triméthoprime, sulfaméthazole, colistine).

La mesure de CMI des antibiotiques a été effectuée selon la technique de dilution en milieu liquide, l'objectif de cette technique est, d'abord, d'évaluer la résistance des souches testées vis-à-vis des antibiotiques sélectionnés et de chercher une éventuelle résistance des aminosides, bien souvent associée à cette résistance [10, 11]. Les antibiotiques choisis ont été sélectionnés selon la résistance connue des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et aux aminosides.

Tests de détection de BLSE

Les BLSE sont des bêta-lactamases plasmidiques qui dérivent des pénicillinases de type **SHV** ou **TEM** capables d'inactiver en particulier les C3G mais sensibles à l'acide clavulanique [12]. Les tests de recherche de BLSE que nous avons utilisé sont : le test de synergie et des tests complémentaires tels que le test à la cloxacilline et le test du rapprochement des disques ainsi que le test du double disque (Figure 1).

Test de synergie

Le test consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de bêta-lactamases et un disque C3G (ceftriaxone, ceftazidime et cefotaxime) ou un monobactame (aztréoname), cette image de synergie dite en bouchon de champagne est caractéristique de la présence de BLSE (Figure 2).

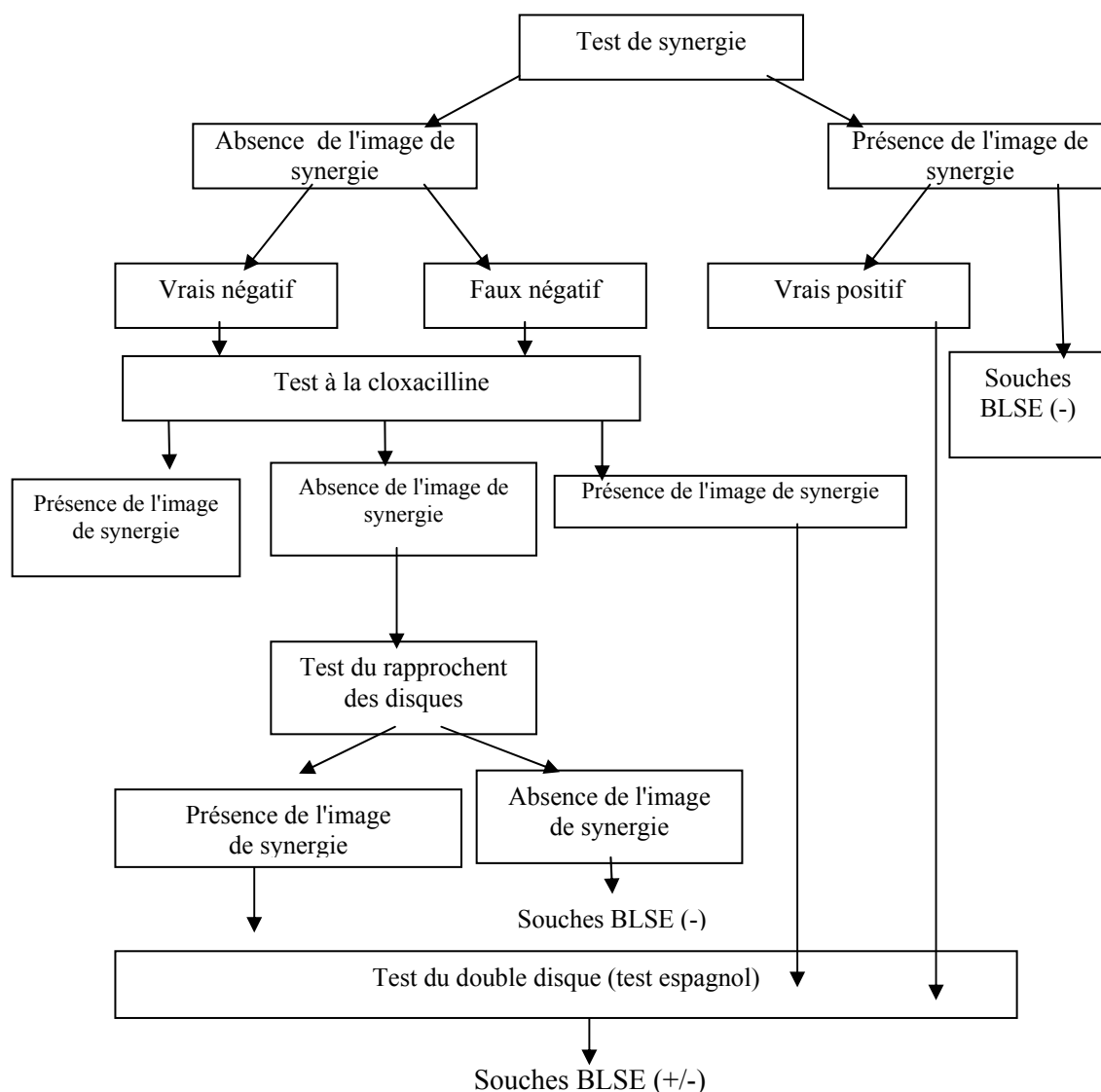


Figure 1. Méthodologie suivie pour la détection des souches de *K.pneumoniae* productrices de BLSE

Un inoculum a été préparé selon la technique N.C.C.L.S. de l'antibiogramme à partir d'une culture de 18 heures. Une gélose Mueller-Hinton a été ensemencée selon la technique N.C.C.L.S. de l'antibiogramme, puis deux disques ; l'un contenant l'association amoxicilline – acide clavulanique et l'autre une cephalosporine de troisième génération ont été placés côte à côte à 3 cm de distance mesurés centre à centre. Les boîtes de pétri étaient incubées pendant 18 heures à 37 °C.

L'image de synergie peut être en bouchon de champagne caractéristique de la BLSE, ou bien en entonnoir correspondant souvent à une hyperproduction de bêta lactames chromosomiques sensibles à l'acide clavulanique (Voir figure 2). Certaines bactéries, comme c'est le cas chez *K. pneumoniae* sont naturellement résistantes à certaines bêta-lactamases naturelles ; la production d'une bêta-lactamase de type penicillinase rend les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux penicillines. Si cette bêta-lactamase est d'une part sensible à l'acide clavulanique et d'autre part capable d'être hyper

produite, la possibilité d'un « Faux positif » de BLSE est prévisible, chez le « Faux positif » la souche étudiée ne possède pas cette enzyme, cela évoque une production élevée de bêta-lactamase chromosomique intrinsèque chez le « Faux négatif » l'image de synergie est absente la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution de diamètre autour des cephalosporines de troisième génération ou des monolactames; CTx \leq 27 mm ; CAz \leq 22 mm ; CRo \leq 25 mm ; ATM \leq 27 mm.

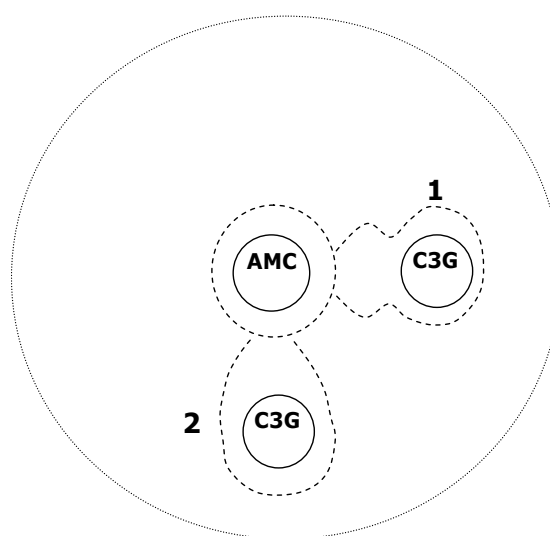


Figure 2. Description de l'image de synergie (Rahal 1999)

① : Synergie en bouchon de champagne, ② : Synergie en entonnoir

Le « Faux négatif » s'observe chez les souches qui possèdent deux mécanismes de résistance aux bêta-lactamines, une BLSE et une hyper production naturelle, la synergie recherchée est masquée par le deuxième mécanisme de résistance. La mauvaise expression de bêta-lactamase (synergie faible) peut être également responsable de « Faux positif ». La lecture du test de synergie s'avère souvent délicate pour cela des tests complémentaires doivent être pratiqués.

Tests complémentaires

Test à la cloxacilline

La cloxacilline ajoutée au milieu pour antibiogramme Mueller-Hinton inhibe très fortement toutes les cephalosporines de la classe A d'Ambler [13]. Si un tel mécanisme de résistance est présent on constate en comparant les boîtes de Pétri contenant le milieu Müeller-Hinton à la cloxacilline une restauration de l'activité des bêta-lactamases et apparition de l'image de synergie en bouchon de champagne recherchée.

Le test à la cloxacilline peut être pratiquée pour l'antibiogramme ou le test de synergie. Dans notre travail il a été pratiqué pour le test de synergie. Nous pouvons constater une restauration de l'activité des bêta-lactamases testées avec une restauration de l'activité des bêta-lactamases testées avec ou sans apparition de l'image de synergie, ou bien pas de restauration de l'activité des bêta-lactamases testés avec ou sans apparition de l'image de synergie ceci nous permet de classer selon le cas le type d'enzyme

(bêta-lactamase) secrétée (penicillinase de haut niveau ou de bas niveau, cephaloporphinase seuls ou avec la présence d'une BLSE).

Test du rapprochement des disques

Lorsqu'un second mécanisme de résistance est susceptible de masquer la présence de l'image de BLSE, il est possible de retrouver cette image de synergie en rapprochant du disque contenant l'acide clavulanique les disques de C3G ou d'aztréonam (15 ou 20 mm centre à centre) la préparation de l'inoculum et l'ensemencement ont été réalisés de la même manière que le test de synergie, le disque contenant l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC) et placé au milieu de la boîte de Pétri, les disques de C3G à différentes distances du disque de l'AMC, 15 puis 20 puis 30 mm mesurés centre à centre selon le schéma explicatif dans la figure 3. La restauration de l'activité du ou monobactame utilisé est traduite par l'apparition de l'image de synergie entre C3G / AMC.

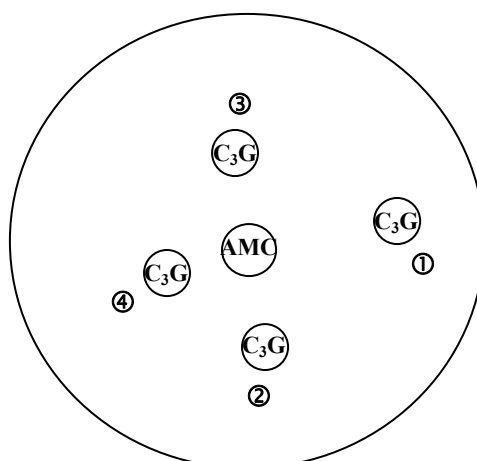


Figure 3. Schéma de détection des BLSE par le test espagnol (Rahal 1999)

- ① Distance entre AMC et C₃G / ou ATM = 30 mm
- ② Distance entre AMC et C₃G / ou ATM = 25 mm
- ③ Distance entre AMC et C₃G / ou ATM = 20 mm
- ④ Distance entre AMC et C₃G / ou ATM = 15 mm

Test du double disque (test espagnol)

La détection de la bêta-lactamases à spectre élargi (ou étendu) peut être confirmée par le test du double disque. Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'association amoxicilline – acide clavulanique (AMC), comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose Mueller-Hinton [14]. Une suspension bactérienne d'une opacité égale à 0,5 MC Farland a été préparée partir d'une culture de 18 h, une gélose Mueller-Hinton est ensuite ensemencée selon la technique de l'antibiogramme. Deux disques l'un contenant l'AMC, l'autre une céphalosporine de troisième génération (CTX) selon le schéma (voir figure 4). La diffusion était faite à la température ambiante du laboratoire pendant une heure, puis le

disque l'AMC est remplacé par un disque contenant la même céphalosporine de troisième génération Les boîtes de Péri sont incubées 18 heures à 35 °C.

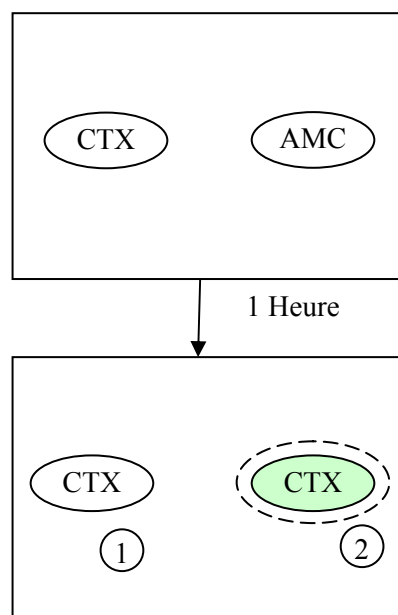


Figure 4. Schéma de détection des BLSE par le test espagnol (Rahal 1999)

Le test est considéré positif si le diamètre de la zone d'inhibition du disque de C3G est inférieur de 4 à 5 mm comparé à celui observé autour du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC.

DETERMINATION DU PHENOTYPE DE RESISTANCE DES BLSE

La détermination des phénotypes de la BLSE se fait par la détection des substrats préférentiels de cette enzyme [15,16], elle se réalise en recherchant les éventuelles images de synergie en bouchon de champagne qui peut paraître, sur la gélose, entre les disques de bêta-lactamines utilisés.

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton a été réalisée selon la technique de l'antibiogramme. Les disques d'antibiotiques suivant : AMC, CAZ, CTX, CRO et ATM ont été placés sur la gélose Mueller-Hinton selon le schéma dans la figure 5. La distance entre deux disques est de 3 cm. Les boîtes de pétri sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

L'interprétation des résultats pour la détection de l'image en "bouchon de champagne" a été faite en se référant aux figures correspondant aux différents phénotypes de résistance de la BLSE produite. Quatre phénotypes ont été initialement décrits parmi les BLSE plasmidiques dérivant de TEM et de SHV et sont les suivants:

- 1. Le phénotype CTX** - Se caractérise par une augmentation équivalente de la résistance au cefotaxime, à la ceftazidime et à l'aztréonam exemples: TEM-3, TEM-4,
- 2. Le phénotype CAZ_a** - Le niveau de résistance à la ceftazidime est plus important que celui du cefotaxime et de l'aztreonam exemple: TEM-12, TEM-7, SHV-6.

2 bis. Le phénotype CAZ_b - Se caractérise par une augmentation très importante de la résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam comparée à une moindre résistance au cefotaxime. Exemple: TEM-24, SHV-4 .

3. Le phénotype ATM - Se caractérise par une résistance contre le disque d'aztréonam avec des diamètres supérieurs à 20 mm pour la ceftazidime et le cefotaxime. Exemple : TEM- 2.

4. Le phénotype TEM-20 - Se caractérise par une légère augmentation de la résistance au cefotaxime, la ceftazidime et l'aztréonam étant peu touchés.

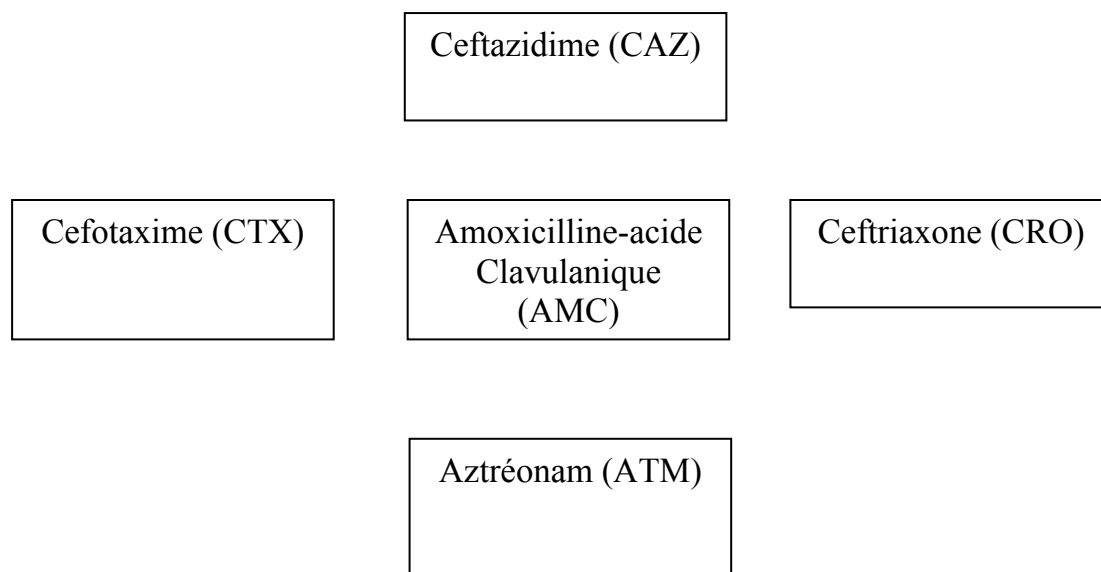


Figure 5. Schéma explicatif de la détermination des phénotypes de résistance de BLSE (Rahal 1999)

ETUDE DE L'INCRIMINATION DES SOUCHES DE *K. PNEUMONIAE* ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT HOSPITALIER DANS LES INFECTIONS NOSOCOMIALES OBSERVEES

Nous nous sommes basés sur l'expression phénotypique de l'ensemble des souches isolées, au cours de la réalisation de notre travail, pour étudier leur incrimination dans les diverses infections nosocomiales. L'expression phénotypique concerne le comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques testés par la détermination de leurs antibiogrammes pour l'ensemble des souches isolées et par la détermination des phénotypes de résistance des BLSE pour les souches productrices de cette enzyme (KpBLSE).

Au total 100 souches de *K. pneumoniae* ont été identifiées 80 souches ont été isolées à partir des prélèvements d'origine pathologique et 20 souches ont été isolées à partir des prélèvements de l'environnement hospitalier.

Description de la population de souches

Les souches de *K. pneumoniae* se répartissaient à part égale pour les deux sexes (41 isolées chez des malades de sexe féminin et 39 de sexe masculin), ce critère physiologique n'influait pas sur les infections nosocomiales par contre celui de l'âge est en rapport avec le statut immunitaire des patients. Nous constatons que cette population de souches est distribuée en quatre tranches d'âge dont la plus importante est celle appartenant aux patients âgés de plus de 50 ans (0 – 2 ans: 10 souches, 03 – 15 ans: 15 souches, 16 – 50 ans: 30 souches, supérieur à 50 ans: 25 souches), conformément à de nombreux rapports [17], les services de réanimation et de chirurgie sont les plus affectés mais aussi d'autres services tels que la pédiatrie et l'urologie.

Les souches que nous avons isolées des urines présentaient 40 % des cas, des sécrétions respiratoires dans 12 % des cas, du sang dans 9 % des cas et des divers sites dans 19 % des cas (pus, sécrétions vaginales et autres) (voir tableau 1). Nous soulignons l'homogénéité de la population étudiée vis-à-vis des antibiotiques notamment aux bêta-lactamines et plus particulièrement aux céphalosporines de troisième génération tels que le cefotaxime (37 %), les céphalosporines de deuxième génération restent efficaces avec tout de même un taux de résistance de 19,4 % pour la cefoxitine (voir tableau 2).

Tableau 1. Répartition de 100 souches de *K. pneumoniae* isolées selon l'origine du prélèvement

Origine du prélèvement	Nombre de souches
Urines	40
Sang	09
Pus	13
Sécrétions vaginales	04
Sécrétions respiratoires	12
Liquide céphalo-rachidien	02
Surface de mur	02
Paillasse	02
Drap de malade	02
Table de malade	02
Mains infirmière	02
Blouse infirmières	02
Savon	02
Sonde d'aspiration	01
Ciseaux	01
Aspirateur	01
Alcool iodé	01
Eosine aqueuse	01
Siphons de lavabos	01

Nous avons noté la résistance de toutes les souches à l'amoxicilline et 04 d'entre elles à l'imipénème, quand à la résistance aux associations amoxicilline, acide clavulanique avec un taux de 52,4 % elle est certainement due à la présence de bêta-lactamase de type TRI (pour TEM résistant aux inhibiteurs).

Les antibiotypes trouvés sont présentés dans : L'antibiotype 3 (souches appartiennent aux phénotype sauvage sensibles à tous les antibiotiques testés à l'exception des résistances naturelles (ampicilline et amoxicilline), l'antibiotype 1 (phénotype imipénème résistant), l'antibiotype 4 (sensibilité à l'ampicilline), l'antibiotype 2 (phénotype BLSE).

Tableau 2. Sensibilité des 100 souches isolées de *K. pneumoniae*

Antibiotique	Abréviation	Pourcentage des souches		
		Résistance	Intermédiaire	Sensible
Ampicilline	AMP	98,4	00	1,6
Amoxicilline	AMX	100	00	00
Acide clavulanique	AMC	52,4	19	28,6
Cefazoline	CZ	63,2	5,3	31,6
Cefoxitine	FOX	19,4	4,1	76,5
Cefotaxime	CTX	37,0	17,8	45,2
Imipénème	IMP	04	00	96
Gentamicine	GN	50,7	01,4	47,9
Amikacine	AM	35,7	04,3	60
Chloramphenicol	C	26,9	00	73,1
Nitrofurantoïne	FT	31,1	14,4	54,4
Trimethoprim/ sulfaméthaxazole	SXT	67,3	00	32,7
Colistine	CO	30,0	05	65

Tests de détection de BLSE

Test de synergie

Les résultats du test de synergie appliqué pour l'ensemble des souches de *K. pneumoniae* isolées sont donnés dans le tableau 3. Parmi les 40 souches chez lesquelles nous avons noté la présence d'une synergie : 30 présentaient des tests faux positif car les images de synergie observées correspondaient à des images de synergie reflétant une hyperproduction de bêta-lactamase chromosomique, la forme s'est présentée en entonnoir, du côté du disque de l'acide clavulanique. (Figure 6).

Tableau 3. Test de synergie pour 100 souches de *K. pneumoniae*

Nombre de souches testées	Résultats	
	Présence de synergie	Description de l'image de synergie
30	+	en entonnoir
10	+	en bouchon de champagne
60	-	/

Les 10 souches, restantes, produisaient une BLSE, la forme en bouchon de champagne du côté de la céphalosporine de troisième génération (cefotaxime dans notre cas) le confirme bien (Figure 7). Les 60 souches chez lesquelles l'image en bouchon de champagne a fait défaut, ont bénéficié du test à cloxacilline.

La suspicion de faux négatif n'est pas exclue dans le cas de la non-apparence de l'image de synergie puis la complémentation des deux mécanismes de résistance; à savoir

l'hyperproduction d'une bêta-lactamase chromosomique et la production d'une BLSE, s'observe chez plusieurs souches dans l'espèce *K. pneumoniae*.

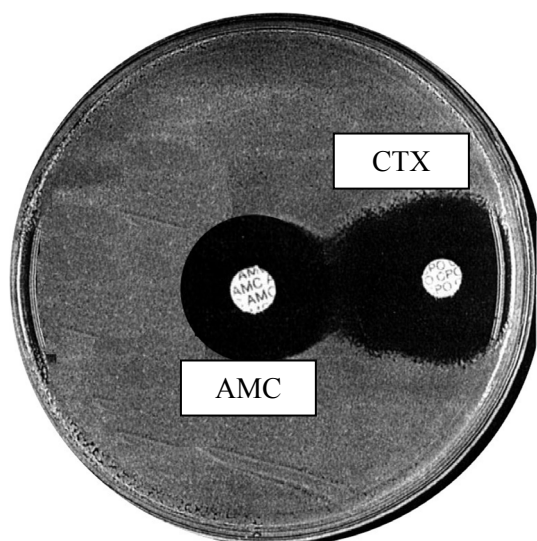


Figure 6. Souche N° 78 hyperproductrice de bêta-lactamase chromosomique.
(Synergie en entonnoir)

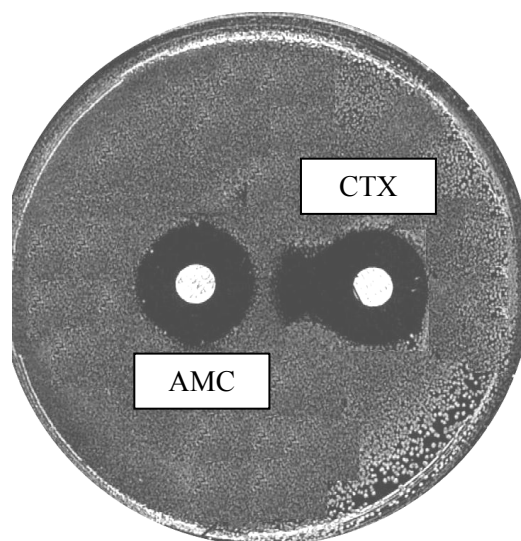


Figure 7. Souche N° 41 présence de l'image de synergie "en bouchon de champagne"

Test à la cloxacilline

Toutes les souches ne présentant pas d'image de synergie ont été testées par le test à la cloxacilline. La première hypothèse que nous avons posé est que les souches dont l'image de synergie est absente sont de faux négatif. Les résultats du test à la cloxacilline a montré une restauration de l'activité des C3G et des associations bêta-lactamamines + inhibiteur de bêta-lactamase (AMC) avec présence d'image de synergie en bouchon de champagne entre C3G et AMC (Figure 8). Nous avons, donc, accepté l'hypothèse; car ces souches se sont avérées sécrétrices, en plus des BLSE, des céphalosporinases qui masquaient leurs présences dans le test de synergie.

Tableau 4. Test à la cloxacilline pour 60 souches de *K. pneumoniae*

Nombre de souches testées	Résultats		
	Présence de l'image de synergie	Description de l'image de synergie	Interprétation
Faux négatif ? Vrais négatif ? 20	+	En bouchon de champagne	BLSE+ Céphalosporinase (faux négatif)
40	-	/	Test du rapprochement des disques

La deuxième hypothèse que nous avons posée est que les souches ne présentant pas d'image de synergie sont de vrais négatifs, c'est-à-dire qu'elles ne produisent pas de BLSE. Les résultats du test à la cloxacilline rapportés dans le tableau 4 a donné deux catégories de souches; la première catégorie dans laquelle l'image de synergie fait

défaut, ces souches ont été, également, testées par le test du rapprochement des disques. Dans la deuxième catégorie, la restauration de l'activité des C3G ainsi que l'AMC a été établie par conséquent l'image de synergie a apparu (Figure 9).

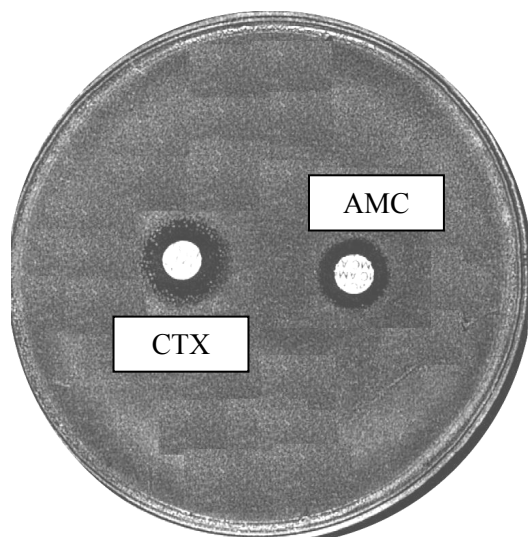


Figure 8. Souche N° 56 absence de l'image de synergie en "bouchon de champagne". La souche ne produit pas de BLSE. Utilisation de la gélose Mueller-Hinton sans cloxacilline.

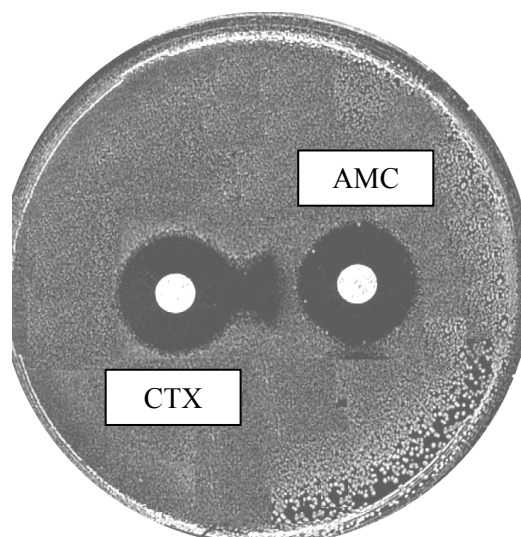


Figure 9. Souche N° 56 utilisation de la gélose à la cloxacilline : apparition de la synergie en "bouchon de champagne". La souche produit une céphalosporinase et une BLSE.

Nous avons, donc, accepté l'hypothèse pour la deuxième catégorie de souches qui produisaient, en fait, une BLSE et des céphalosporinases et poursuivrons l'investigation en ce qui concerne la première catégorie de souches; dans ce sens elles ont été testées par le test du rapprochement de disques.

Test du rapprochement des disques

Le test du rapprochement des disques appliqué pour 40 souches de *K.pneumoniae* a donné les résultats qui figurent dans le tableau 5. Ce test a mis en évidence la production de BLSE chez seulement 5 souches, car ces souches secrètent leur pénicillinases avec un haut niveau ce qui masque l'image de synergie caractéristique de la BLSE. Nous remarquons dans nos résultats que la mise en évidence de la BLSE avec un seul test (test de synergie) n'a été obtenue que chez 10 souches.

Tableau 5. Test du rapprochement des disques pour 40 souches de *K. pneumoniae*

Nombre de souches testées	Résultats		
	Présence de l'image de synergie	Description de l'image de synergie	Interprétation
35	-	/	Pénicillinase de haut niveau
05	+	En bouchon de champagne	BLSE+ pénicillinase de haut niveau

Conformément à la littérature *K. pneumoniae* peut produire plus d'une bêta-lactamase, ce qui rend la détection d'une BLSE laborieuse ceci ressort dans les résultats du test à la cloxacilline; chez 20 souches la production de BLSE était couplée par une hyperproduction de céphalosporinase, la cloxacilline qui est un inhibiteur de cette classe de céphalosporinases (AMPC plasmidiques) démasque alors l'image de synergie révélant la présence d'une BLSE.

Parmi 40 souches suspectées d'être de faux négatifs, 35 souches se sont avérées de vrais négatifs car testées par le test du rapprochement de disques elles se sont avérées productrices de pénicillinases de haut niveau (Figures 10 et 11).

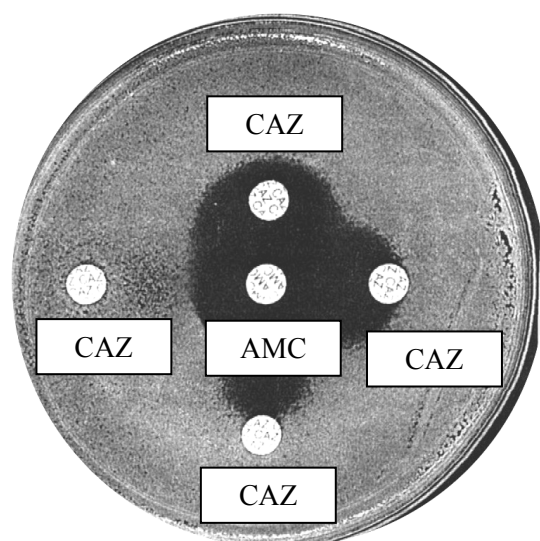


Figure 10. Souche N° 6 produisant une pénicillinase de haut niveau (Le disque de céftazidime est placé à 30, 25, 20 et 15 mm d'un disque contenant de l'acide clavulanique, centre à centre) (test du rapprochement des disques)

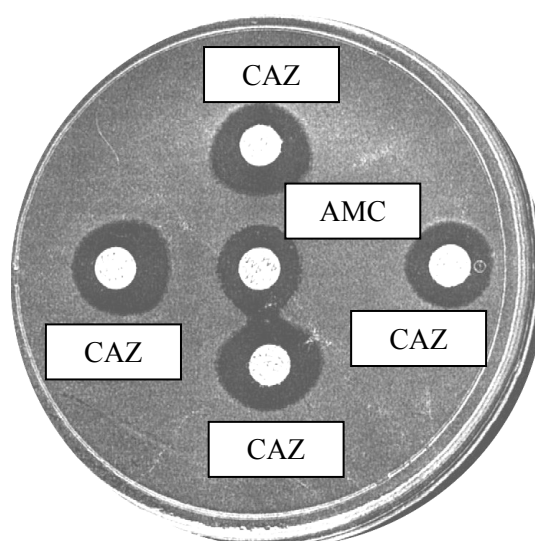


Figure 11. Souche N° 41 produisant une pénicillinase de haut niveau et une BLSE (Le disque de céftazidime est placé à 30, 25, 20 et 15 mm d'un disque contenant de l'acide clavulanique, centre à centre) (test du rapprochement des disques)

Les synergies en forme d'entonnoir, observées du côté de l'acide clavulanique ont été obtenues chez 30 souches. Leur interprétation est simple, car il est clair qu'elles ne correspondent pas à une BLSE, du fait de leur forme et leur position, qui ne ressemblent pas aux synergies caractéristiques en bouchon de champagne.

Test du double disque

Nous avons jugé important, de confirmer la présence de la BLSE chez les souches présentant une synergie entre C3G et AMC. C'est ainsi qu'elles ont été testées par le test du double disque. L'affirmation de la détection des bêta-lactamases à spectre étendu a été constatée chez 35 souches (Figure 12).

Notons que l'augmentation du diamètre autour du disque du cefotaxime précédé par la diffusion de l'AMC a été observée plus élevée chez quelques souches (exemple la souche N° 23). Ceci est en rapport avec la variation de l'expression phénotypique in vitro des BLSE et du niveau de leurs productions. (Figure 12).

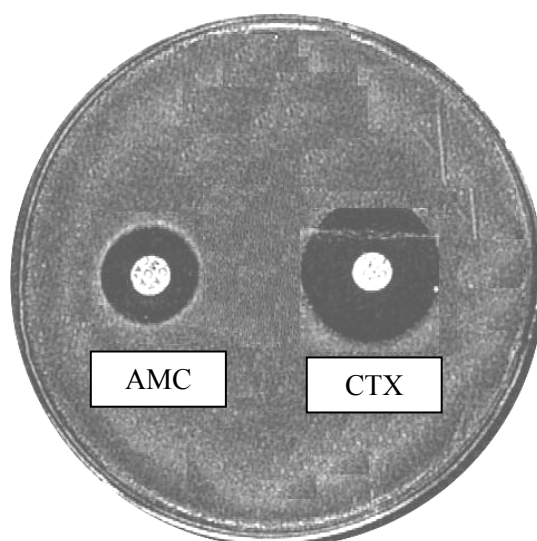


Figure 12. Souche N° 23 Test du double disque positif : la souche produit une BLSE.
(diamètre de la zone d'inhibition autour du disque CTX précédé par diffusion du disque AMC = 10 mm)

DESCRIPTION DES 35 SOUCHES PRODUCTRICES DE BLSE

La population des souches K_pBLSE varie peu selon le type de prélèvement même pour ceux qui sont en rapport avec les infections graves (hémoculture, pus et prélèvements respiratoires). En revanche la population de ces souches varie selon le type de service hospitalier (voir tableau 6). Ce résultat est similaire à celui obtenu dans une enquête menée dans 23 hôpitaux français à Paris [18].

Elles sont isolées principalement dans les services de réanimation (08 souches) puis dans les services de traumatologie, néphrologie et pneumologie (05 souches chacun) et enfin dans les services de pédiatrie et urologie (03 souches chacun), un quart (1/4) des souches isolées des urines sont productrices des BLSE, environ un demi (1/2) du sang et un tiers (1/3) du pus.

Les souches K_pBLSE résistantes à certains bêta-lactamines présentaient aussi une résistance associée aux aminosides, aux sulfamides et au chloramphénicol. Les taux de résistance à certains antibiotiques observés dans notre étude apparaissent importants (cefoxitine 47,7 %, les nitrofurantoïnes 31,1 %, le chloramphénicol 86,4 %, la colistine 54,8 %).

CMI DES CEFOTAXIME (CTX), CEFTAZIDIME (CAZ) ET GENTAMICINE (GN) DES 35 SOUCHES K_pBLSE

Les 2/3 des souches K_pBLSE étaient résistantes à la gentamicine (les taux varient de 4 à des valeurs > 16 mg/mL, les taux pour la ceftazidime sont un peu élevés, ils varient de 32 à des valeurs > 512 mg/mL comparés aux cefotaxime, ceux-ci varient de 16 à des valeurs > 512 mg/mL).

Tableau 6. Distribution des 35 souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE (KpBLSE) en fonction du type de prélèvement et du service où elles étaient prélevées

Souches de <i>K. pneumoniae</i>	Nombre total	Nombre de souches KpBLSE
Tous services et tous prélèvement	100	35
Tous, prélèvements dont :		
Paillasse	01	01
Surface de mur	01	-
Aspirateur	01	-
Sonde aspirateur	01	-
Table du patient	02	-
Drap du patient	02	02
Mains infirmière	02	01
Savon	02	02
Ciseaux	02	01
Blouse infirmière	02	-
Alcool iodé	01	01
Eosine aqueuse	01	-
Siphon de lavabo	01	-
Urines	40	10
Sang	09	06
Pus	13	04
Sécrétions respiratoires	12	05
Liquide céphalo-rachidien	02	01
Sécrétions vaginales	04	01
Tous services dont :		
Réanimation	18	08
Pédiatrie	09	03
Médecine interne	04	01
Endocrinologie	04	01
O.R.L.	07	01
Hématologie	03	01
Traumatologie	10	05
Gynécologie	04	01
Pneumologie	10	05
Néphrologie	10	05
Infectieux	06	01
Urologie	13	03

Dans notre travail, en plus, nous avons tenté de confirmer l'incrimination des souches isolées dans les infections nosocomiales observées pendant la période de notre enquête, par la comparaison des phénotypes de BLSE dans le cas des souches productrices de BLSE et des antibiotypes trouvés chez l'ensemble des souches isolées.

Nous avons pu mettre en évidence la présence de 20 souches aussi bien chez les malades hospitalisés que dans leur environnement, ceci nous conduit à conclure que les souches de *K. pneumoniae* peuvent être transmises d'un réservoir humain à un réservoir environnemental ou le cas contraire via des procédures invasives (soins, interventions chirurgicales ou autre) (voir le tableau 6).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Prévot, A.R.: *Traité de Systématique Bactérienne*, Vol. 2, Dunod, Paris, **1961**, 771.
2. Bagley, S.T., Seidler, R.J., Brenner, D.J.: *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments, *Curr. Microbiol.*, **1981**, 6, 105.
3. Ferragut, C., Izard, D., Gavini, F., Kersters, K., Deley, J., Leclerc, H.: *Klebsiella trevisanii*. A new species from water and soil, *Int. J. syst. Bacteriol.*, **1983**, 33, 133.
4. Richard, C.: Nouvelles espèces de *Enterobacteriaceae* (1979-1983). *Bull. Inst. Pasteur.*, **1984**, 82, 255.
5. Richard, C.: Bactériologie et épidémiologie des espèces du genre *klebsiella*, *Bull. Inst. Pasteur*, **1982**, 80, 127.
6. Sakazaki, R., Tamura, K., Kosako, Y., Yoshiz. E.: *Klebsiella ornithinolytica* sp. Nov, formuley known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoxa*, *Curr. Microbiol.*, **1983**, 18, 201.
7. Izard, D., Ferragut, C., Gavini, F., Kersters, K., de Ley, J., Leclerc, H.: *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1981**, 31, 116.
8. Gavini, F., Izard, D., Grimont, P.A.D., Ageron, A.E., Leclerc, H.: Priority of *Klebsiella planticola*; Bagley, Seidler, and Brenner over *Klebsiella trevisanii* Ferragut, Izard, Gavini, Kersters, Deley, and Leclerc 1983, *Int. J. Syst bacteriol.*, **1986**, 36, 486.
9. Bush, K.: New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy, *Clin. Infect. Dis.*, **2001**, 32, 1085-1089.
10. Jacoby, S.: Properties of plasmid responsible for production of extended spectrum bêta-lactamases antimicrob, *Agent chemother.*, **1991**, 35(1), 164.
11. Berche, P., Gaillard, J.L., Simmonet, M.: *Bactériologie. Bacteries des Infections Humaines*, Flammarion Medecine-Sciences, Paris, **1988**, pp. 660.
12. Phillipon, A., Fournier, G., Paul, G., Wedel, G., Nevot, P.: Détection et distribution des bêta-lactamases à spectre élargi chez les entérobactéries, *Medicinal. Infect.*, **1988**, 12, 869.
13. Ambler, R.P.: The structure of beta-lactamase. *Philtrans, R. Soc. Lond.*, **1980**, B289, 321.
14. Rahal, K. : *Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S.*, I.N.S.P. Algérie, **1999**.
15. Fernandez-Rodriguez, A., Canton R., Pez-Diaz J.C., Martinez-Beltran J., Picazo J.J., Baquero F.: Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extented-spectrum bêta-lactamases antimicrols, *Agents chemother*, **1992**, 36, 2536.
16. Miller G.H., Sabatelli, F.J., Naples L., Hare R.S., Shaw K.J.: The amioglycoside resistance study groups: The most frequently occuring aminoglycoside resistance mechanism combined results of surveys in eight regions of the world, *J. chemother.*, **1995**, 7(2), 17.
17. Hadjar, J., Cetre, J.C., Nicolle, M.C., Perraud, M., Guignement, S.: Infections nosocomiales, épidémiologie, évaluation, techniques, environnement, qualité, sécurité, *Hygiènes*, **2000**, VIII(3).
18. Beytout, J.: Bactéries multirésistantes, *Option Hôpital dossier Ed. Roussel et Diamant*, **1995**.