

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE SOUCHES DE *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* ISOLEES A L'HOPITAL UNIVERSITAIRE DE CONSTANTINE, ALGERIE.

Reçu le 21/01/2009 – Accepté le 25/11/2009

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude des isolats de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* ainsi que leur dissémination clonale à l'Hôpital Universitaire de Constantine. De novembre 2002 à juin 2004, 170 souches de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* (Kp) ont été recueillies. Notre travail a porté sur 52 d'entre elles. Trois marqueurs épidémiologiques sont utilisés : le biotype, l'antibiotype et le pulsotype ainsi que le test du χ^2 avec analyse de la variance pour la comparaison des taux d'incidence d'une année à l'autre. Cinq biotypes ont été déterminés dont un prédominant ainsi que cinq antibiotypes. L'électrophorèse en champ pulsé montre la présence de 4 principaux clones et de 28 clones isolés. Ces résultats soulignent que la pulsotypie est la technique la plus discriminante.

Mots clés : *béta-lactamases à spectre étendu (BLSE) - Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae - Résistance aux antibiotiques- Marqueur épidémiologique.*

Abstract

Phenotypic and genotypic characterization of klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae strains isolated in university hospital of constantine, algeria.

The objective of this survey is the study of isolates of *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* as well as their clonal dissemination in the University Hospital of Constantine.

From November 2002 to June 2004, 170 strains of *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* (K.p) have been collected. Our work was carried out on 52 of them. Three epidemiological scores are used: biotype, antibiotype and pulsotype and the variance analysis, with the χ^2 test for the comparison year to year. Five biotypes are determined of which one is predominant and also five antibiotypes. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) gave 4 main clones as well as 28 isolated clones. These results reveal that the pulsotyping is the most discriminative criteria.

Keywords: *extended-spectrum beta-lactamases (EBLS)- Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae - antibiotic resistance - epidemiological score.*

N. ARAFA ¹
F. SMATI ²
J. M. SCHEFTEL ³
O. MEUNIER ⁴

¹ Laboratoire de Génie Microbiologique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

² Laboratoire de Microbiologie CHU de Constantine, Algérie.

³ Laboratoire de Bactériologie, Hôpital civil, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

⁴ Laboratoire d'Hygiène, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France.

ملخص

Klebsiella pneumoniae
170 . 2004/2002

52

(χ^2)

28

-β-

-

- *Klebsiella pneumoniae*; الكلمات المفتاحية

Les infections à *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* (K.p) et surtout à *K.pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) représentent une cause importante de morbidité et de mortalité en milieu hospitalier.

Klebsiella pneumoniae se propage manifestement de manière épidémique et est responsable d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. La mise en évidence du caractère épidémique de l'infection est importante pour la mise en œuvre rapide des mesures préventives.

Dans cet optique, nous nous sommes intéressés à mesurer d'abord la fréquence de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux. Cette fréquence est déterminée en fonction des services et des prélèvements. Ensuite nous avons vérifié la clonalité des souches, étudié la dissémination clonale à l'hôpital en réalisant l'antibiotypie, la biotypie, et la pulsotypie. Afin d'obtenir une information épidémiologique plus précise, une analyse statistique avec le test du χ^2 a été réalisée pour la comparaison des taux d'incidence d'une année à l'autre.

MATERIEL ET METHODES

Souches de *K. pneumoniae* utilisées

Notre étude porte sur 52 souches parmi les 170 souches recueillies, les 52 ayant servi à la biologie moléculaire et isolées entre novembre 2002 et juin 2004. Ces souches proviennent essentiellement des services de réanimation, de médecine interne, de chirurgie et de néonatalogie. Ainsi que de différents prélèvements pathologiques. Les tests de Biotypie, antibiotypie et pulsotypie sont réalisés pour chacune des souches. Les 52 souches se répartissent entre 44 souches hospitalières et 8 communautaires.

Biotypie et antibiotypie

Les 52 souches ont fait l'objet d'une identification biochimique avec le système API 20E® (bioMérieux., Marcy l'Etoile, France). Un antibiogramme comportant 22 antibiotiques a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu Muller Hinton selon les recommandations du NCCLS [1]. Parmi les β -lactamines les molécules suivantes sont testées: des pénicillines, dont l'amoxicilline (AMX), l'association amoxicilline+ ac-clavulanique (AMC); des ureidopenicillines dont la piperacilline (PIP) et piperacilline + tazobactam (TZP); des carboxypenicillines, dont la ticarcilline (TIC) et ticarcilline+ ac-clavulanique (TCC). Comme céphalosporines de première génération (C1G), la céfalotine (CF), la céfoxitine (FOX) et le cefotetan (CTT) comme céphalosporines de deuxième génération (C2G). La ceftazidime (CAZ), et le cefotaxime (CTX) comme (C3G). Comme monobactam l'aztreonam (ATM). Les aminoglycosides testés sont: la gentamicine (GN), la tobramicine (TN), amikacine (AN) et isépa mycine (ISP). Pour Les fluoroquinolones: l'acide nalidixique (NAL) comme quinolone de première génération, la ciprofloxacine (CIP) et l'ofloxacine comme fluoroquinolones. Enfin le triméthoprim sulfaméthaxazol (SXT) comme sulfamides.

La recherche d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) est effectuée par la mise en évidence d'une synergie entre les molécules d'amoxicilline-ac-clavulanique et le céfotaxime, l'aztreonam, la céftazidime et le céftriaxone.

Les souches de diamètre diminué aux C3G (CTX \leq 27mm, CAZ \leq 22mm, ATM \leq 27mm) avec absence d'image de synergie ont fait l'objet d'une recherche de céphalosporinase de haut niveau (CHN) par le test à l'oxacilline [1]. Les CMI sont déterminées à l'aide d'un automate VITEK 2 en utilisant les cartes VITEK AST N 017® pour antibiogramme de bacilles à Gram négatif (bioMérieux), à partir d'une suspension à 0,5 Mac Farland.

Electrophorèse en champ pulsé

La pulsotypie est réalisée sur les 52 souches en utilisant le Kit Gène Path ® Cremp 3 Reagent Kit (BioRad-Diagnostic, Ivry-sur -Seine, France), selon la méthode indiquée par le fabricant, et en utilisant l'enzyme de restriction *SpeI*.

RESULTATS

Souches et malades

Cinquante deux isolats de *K. pneumoniae* provenant de 52 patients sont recueillis, soit une souche par malade. Les souches testées se répartissent en 28 souches isolées de femmes et 24 souches isolées chez des hommes. Cette répartition presque à part égale nous indique que le sexe n'a pas d'influence. Les prélèvements de pus occupent la place de vedette avec une fréquence de 46.5%, suivis des prélèvements des urines et de sang avec respectivement 25.2% et 28.3%. La répartition selon les services donne 34.7% de souches isolées de la réanimation, 24.7% des unités fonctionnelles de médecine interne, 24.7% de chirurgie et 12.3% de néonatalogie. Parmi l'ensemble des 52 souches de K.p isolées, 31/52 soit environ (60%) se sont révélées productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (K.p BLSE+). Le service pourvoyeur de ces K.p BLSE+ est essentiellement le service de réanimation. Les malades porteurs de ces *Klebsiella pneumoniae* et surtout de *K. pneumoniae* BLSE +, sont des patients qui ont fait de longs séjours à l'hôpital, essentiellement dans les services de réanimation, de chirurgie ou de médecine. Ces patients sont sondés, ventilés et surtout traités par des antibiotiques à large spectre.

Biotypie

L'analyse en galerie API 20E a permis de caractériser 5 profils numériques différents, le 5215773, le 5205773 (urée -), le 5214773 (VP-), le 52155573 (inositol-), le 5205573 (urée-, inositol-). Parmi ces profils, le 5215773 est le prédominant; il est retrouvé dans 47 cas sur les 52; soit une fréquence de 90,38%, suivi du profil numérique 5205773 avec 7,69% et du 5214773 avec 5,76%; les profils 5215573 et 5205573 sont retrouvés avec une fréquence de 3,84%.

Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

Les résultats de l'étude de la sensibilité des 52 isolats de *Klebsiella pneumoniae* (tableau 1) aux 22 différents antibiotiques utilisés montrent que toutes les souches sont 100% résistantes à l'amoxicilline, résistantes à hauteur de 81% à l'AMC, et de 77% aux céphalosporines de première génération. Le tazobactam associé à la pipéracilline (tazopipéracilline) réduit la résistance de *Klebsiella pneumoniae* à la pipéracilline (33% contre 81% respectivement).

Tableau 1 : Pourcentage de sensibilité aux bêta-lactamines de *K. pneumoniae*. n=52

	AMX	AMC	CF	PIP	TZP	TIC	TCC
% R+I	100	81	77	81	33	96	69
%S	0	19	23	19	67	4	31

	CTX	CAZ	FOX	CTT	FEP	ATM	IPM
% R+I	67	62	0	0	62	67	0
% S	33	38	100	100	38	33	100

AMX : amoxicilline ; **AMC :** amoxicilline ac-clavulanique ; **CF :** cefalotine ; **PIP :** piperacilline ; **TZP :** piperacilline-tazobactam ; **TIC :** ticarcilline ; **TCC :** ticarcilline-ac.clavulanique ; **CTX :** cefotaxime ; **CAZ :** ceftazidime ; **FOX :** cefoxitine ; **CTT :** cefotetan ; **FEP :** cefepime ; **ATM :** aztreonam ; **IMP :** imipénème

La résistance de Kp aux céphalosporines de troisième génération (C3G) d'utilisation courante comme le céfotaxime est de 67%. L'imipénème reste la molécule la plus efficace, aussi bien sur les K.p que sur les K.p BLSE+. Concernant les aminosides, on observe une résistance assez marquée pour la gentamicine et la tobramycine avec des résistances de 67% et 65% respectivement (tableau 2).

Tableau 2 : pourcentage de sensibilité de *K.pneumoniae* aux aminosides n=52

	GN	TN	AN	ISP
% R+I	67	65	52	46
% S	33	35	48	54

GN : gentamicine ; **TN :** tobramycine ; **AN :** amikacine ; **ISP :** isépanmycine

Pour l'amikacine et l'isépanmycine on note des taux de résistance respectivement de 52% et 46%. Les fluoroquinolones montrent une excellente activité puisque les 52 souches de *K.pneumoniae* sont toutes sensibles à l'ofloxacine et à la ciprofloxacine. (Tableau 3). Cependant

un taux de résistance de 35% est observé pour l'acide nalidixique.

Tableau 3 : pourcentage de sensibilité de K.p aux fluoroquinolones et aux sulfamides. n= 52

	NAL	OFX	CIP	SXT
R+I %	35	0	0	67
%S	65	100	100	33

Répartition des phénotypes de résistance de *Klebsiella pneumoniae*

Le tableau 4 montre une forte proportion de *K.pneumoniae* BLSE + qui s'élève à environ (60%), suivi du phénotype pénicillinase bas niveau (PBN) à 27% correspondant au phénotype sauvage, le phénotype pénicillinase haut niveau (PHN) est à 13%. On note aussi la présence d'une souche pénicillinase résistante aux inhibiteurs (TRI) avec une fréquence de 2%.

Tableau 4 : Phénotypes de résistance de *K.pneumoniae*

Phénotype	PBN	PHN	TRI	BLSE	TOTAL
Nombre et %	14 (27)	7(13)	1(2)	31(60)	52 (100)

PBN : Pénicillinase à bas niveau ou phénotype sauvage, **PHN :** Pénicillinase à haut niveau, **BLSE :** Béta-lactamase à spectre étendu, **TRI :** Pénicillinase résistante aux inhibiteurs

Les images de synergie (figure1) et les valeurs de CMI moyenne du céfotaxime (41 µg/L) par rapport à la ceftazidime (14 µg/L) (tableau 5) laisse penser à des K.p productrices de bêta-lactamase à spectre étendu type CTX-M Arlet et Philippon (2003).

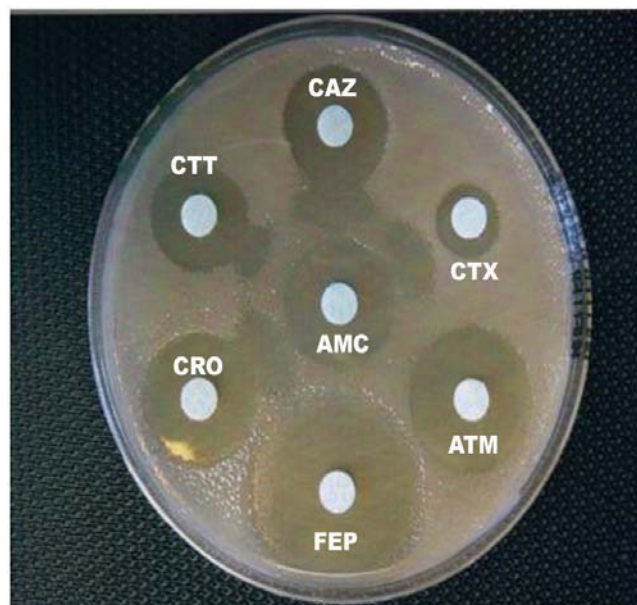


Figure 1 : *K. pneumoniae* BLSE (+) images de synergie

Tableau 5 : CMI moyennes *K. pneumoniae* selon le phénotype

ATB	AMX	AMC	TIC	TCC	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	IPM
PBN	>=32	<=2	>=128	<=8	<=4	<=2	<=4	1<=	<=1	<=1
PHN	>=32	13	>=128	59	<=4	46	5	3	2	<=1
BLSE	>=32	18	>=128	73	12	>=64	<=4	41	14	<=1

Electrophorèse en champ pulsé

L'analyse du dendrogramme (figure 2) à partir des résultats des gels d'électrophorèse montre que 24 souches sur les 52 sont classées dans 4 clones différents, chaque clone regroupant des souches liées épidémiologiquement. En revanche les 28 souches restantes, chacune appartient à un clone unique ou isolé, et par conséquent sans liaison épidémiologique. Sur les 24 souches des 4 clones, il y'a 16 K.p BLSE +.

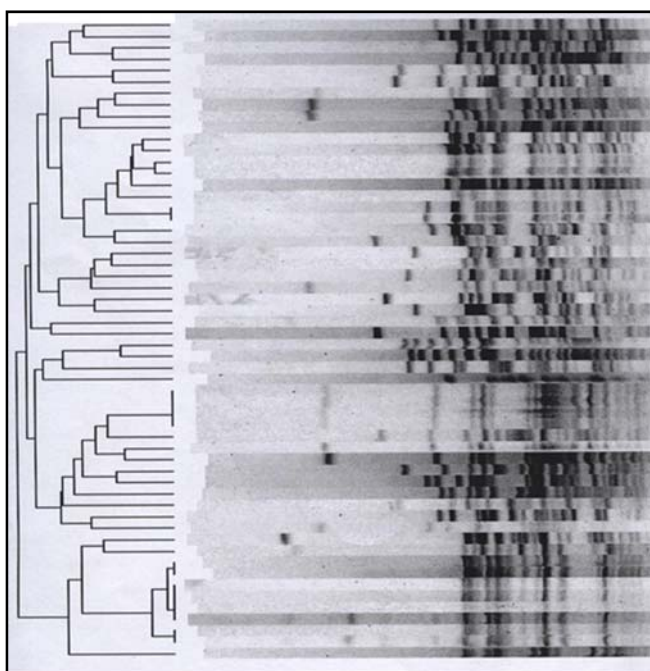


Figure 2: Dendrogramme représentatif de l'électrophorèse en champ pulsé.

Le premier clone contient 4 souches hospitalières dont 3 K.p BLSE + et 1 sauvage. Deux des Kp BLSE + ont été isolées successivement en mars et mai 2004, la première isolée d'une sonde vésicale (service de réanimation), la seconde des urines (service de médecine interne), la troisième Kp BLSE + a été isolée en 2003 d'une hémoculture (service de médecine interne). La souche sauvage est isolée également de la réanimation à partir d'un prélèvement de pus. On note une répartition à part égale des souches du clone I, dans le service de médecine interne et de réanimation.

Le deuxième groupe clonal comprend 10 souches dont 5 Kp BLSE +. Une Kp BLSE + a été isolée en 2003 du service de réanimation, à partir d'une aspiration trachéale. Les quatre autres Kp BLSE + ont été isolées en 2004 essentiellement du service de réanimation (3 hémoculture et

une aspiration trachéale). Les 5 souches restantes sont isolées de prélèvements et de services différents, cependant elles ont toutes été isolées entre avril et juin 2004.

Le troisième clone contient 6 souches dont 5 Kp BLSE +. Ces Kp BLSE + ont été isolées entre avril et juin 2004. Parmi les 6 souches, 3 proviennent du service de médecine (deux prélevées des hémocultures et une du pus), une de chirurgie prélevée de pus de plaie et une d'orthopédie, prélevée également de pus. La 6^{ème} souche du clone a été isolée en avril 2003 d'une hémoculture du service de néonatalogie. Cette souche présente une résistance associée très importante entre céfotaxime et les quatre aminosides testés.

Le quatrième clone comprend 4 souches dont 3 K.p BLSE + et une souche sauvage. Les Kp BLSE + ont été recueillies entre janvier et avril 2004. Une Prélevée des urines et du service de maternité, les deux autres de deux sondes vésicales au service de réanimation. La souche sauvage a été prélevée en février 2004 du service de réanimation (sonde vésicale).

DISCUSSION

Durant les dernières décennies, *Klebsiella pneumoniae* est devenue une importante cause d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. Des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques, surtout en néonatalogie, médecine interne et soins intensifs. Les résultats de notre étude montrent que la répartition selon les services indique que le service de réanimation occupe la place de vedette aussi bien pour les K.p que pour les K.p BLSE+.

La répartition des souches en fonction des prélèvements souligne une prédominance des souches dans les prélèvements de pus et sérosités, ce résultat Le service de réanimation reste le carrefour idéal pour la propagation des K.p BLSE+, ce qui est certainement la conséquence d'une utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques, ou encore le manque d'une détection rapide de ces K.p BLSE+, et de surcroît un manque d'hygiène, puisque la transmission est manu portée. Concernant la résistance aux antibiotiques, Il est bien connu que les β-lactamines sont les antibiotiques de premier choix pour le traitement des infections à K.p aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant.

Les résultats de notre étude montrent un taux de résistance naturelle à l'ampicilline, amoxicilline, 100% résistants et aux carboxypénicillines. La résistance à l'association amoxicilline-ac.clavulanique, aux C1G, aux ureidopénicillines va de 81% pour l'AMC, 77% pour la cefazoline, à 81% pour la pipéracilline. Les inhibiteurs des β-lactamases rétablissent l'action de ces antibiotiques pour des taux de résistance bien plus faibles.

Des résistances croisées sont observées entre les pénicillines et les céphalosporines à large spectre ; en effet les isolats résistants à la tazopiperacilline étaient également résistants à la ceftazidime et au cefotaxime. Notre étude

montre des taux de résistance élevés pour le cefotaxime et la ceftazidime, 67% et 62% respectivement. La résistance à la ceftazidime et au cefotaxime est un marqueur important pour la détection de production des BLSE. Par ailleurs [3] rapporte qu'une β -lactamase type SHV-1 ainsi que des protéines de la membrane externe seraient à l'origine d'un haut niveau de résistance pour la tazopipéracilline et la ceftazidime à la fois. De plus la résistance à la ceftazidime est en relation étroite avec son mode d'administration et les doses administrées [4].

Les données de nombreuses études ont montré que l'exposition aux céphalosporines à large spectre est un facteur de risque pour l'émergence de la résistance à ces produits. Ceci est particulièrement problématique, puisque le développement de la résistance aux C3G est associé avec l'augmentation de mortalité, de la durée d'hospitalisation, et l'augmentation des charges hospitalières [5].

En France et comme le montre une étude multicentrique sur trois années, où une augmentation de sensibilité de *K.p* aux céphalosporines a été observée, la baisse de la résistance est probablement une conséquence des mesures de contrôle épidémique instaurées dans ces hôpitaux [6].

Dans notre étude sur l'ensemble des souches étudiées, la production de β -lactamases qui inactive principalement les aminopénicillines, est le mécanisme de résistance le plus fréquent 60% de *K.p* BLSE+. Ce taux éloigné des données nationales rapportées par le Réseau de Surveillance des Résistances Bactériennes aux Antibiotiques (RSRBA) de 2007 parlant de 40,2% de *K.p* BLSE+. Ceci nous informe néanmoins que la situation nationale globale en matière de résistance est préoccupante, et ne semble pas maîtrisée. Nos résultats sont également très éloignés de ceux de France, rapportés dans une étude multicentrique [7] indiquant une fréquence de 3% de *K.p* BLSE+ parmi les isolats de *K.p* étudiés. Une autre étude multicentrique en France parle seulement de 1,23% de *K.p* BLSE+ sur 1061 souches de *K.p* [8]. Le séquençage par PCR de nos *K.p* BLSE+ a révélé qu'il s'agit de BLSE type CTX-M-3. (Résultat non encore publié).

Par ailleurs l'imipénème reste la molécule la plus active, surtout vis-à-vis des *K.p* BLSE+. Dans notre étude l'apparition de souches hospitalières avec des sensibilités diminuées nous interpelle à un suivi et un contrôle plus étroit de la résistance à cet antibiotique, puisque les carbapénèmes représentent la dernière ligne de défense dans l'armement antimicrobien contre les infections sérieuses ou invasives Pasteran 2008. Aujourd'hui il y'a une rapide dissémination des *K.p* productrices de carbapénémases, spécialement en Israël [9] et au nord des Etats Unis [10] où des épidémies à *K.pneumoniae* carbapénèmes résistantes (KPCR) sont enregistrées. Les KPCR sont isolées durant ou après l'admission dans une unité de soins intensifs dans 66% des cas, longs séjours avant l'isolement de la *K.p*, ventilation mécanique, port de cathéter, et surtout traitement avec imipénème et vancomycine [9]. En revanche, sur le plan thérapeutique

beaucoup d'auteurs rapportent que pour les souches résistantes à l'imipénème, une association imipénème plus une fluoroquinolone ou un aminoside augmenterait l'effet antagoniste de cet antibiotique [11]. Keyan et Rubinstein (2007).

En ce qui concerne les quinolones un taux de résistance de 35% est observé pour l'ac-nalidixique, ce ci pourrait refléter l'usage fréquent de cet antibiotique, et conséquence de pression de sélection, pour cet antibiotique dans le traitement des infections urinaires.

Dans notre étude et bien que durant la période d'étude toutes les souches recueillies sont à 100% sensibles aux fluoroquinolones testés; élément valable aussi pour les *K.p* BLSE+, ce ci est probablement du au fait que la résistance aux quinolones est communément acquise à travers une mutation chromosomique que par échange de plasmides, ou bien encore des changements dans la perméabilité ou efflux [12]. Winikor 2000. Ce résultat diffère de celui rapporté par [11] où la résistance aux fluoroquinolones parmi les *K.p* BLSE+, varie entre 18% à 56%.

D'autre part des études récentes dans notre centre d'étude, montrent également une évolution vers la résistance pour les fluoroquinolones, ce qui constitue une vraie menace concernant l'efficacité des fluoroquinolones et ce à deux niveaux: d'abord la présence des mécanismes de résistance sur des plasmides conjugatifs favorise leur mobilité et leur dissémination, de plus leur association à d'autres déterminants de résistance essentiellement β -lactamines et aminosides concourt à une Co-sélection de la résistance aux fluoroquinolones par ces derniers antibiotiques largement utilisés.

Concernant les aminosides, on assiste à une résistance assez marquée pour la gentamicine et la tobramicine de 67% et 65% respectivement. En revanche l'amikacine reste relativement plus efficace avec un taux de résistance plus bas, touchant 52% des souches. D'autre part on observe que les souches résistantes aux aminosides étaient également résistantes aux β -lactamines Ces résultats soulignent bien la résistance associée β -lactamines et aminosides.

Si on analyse nos résultats dans leur ensemble, on peut dire que durant la période considérée (septembre 2002 à juin 2004), au moins quatre foyers à *K.p* se sont implantés dans nos services à haut risque, avec émergence de *K.p* BLSE +, surtout durant la période mai-juin 2004, ceci bien que les résultats de l'antibiotype, du biotype, du pulsotype ne sont pas tout à fait superposables, du fait que les gènes de résistance sont portés essentiellement par des plasmides, qui sont facilement transférés d'une bactérie à l'autre, ce qui leur fournit un potentiel pour une propagation rapide.

La recherche de la clonalité des souches montre qu'il n'y a pas un clone unique, mais qu'il s'agit plutôt de plusieurs clones qui se sont implantés dans nos services, et le fait que le même clone pourrait contenir des souches de 2002 et de 2004, nous laisse supposer que la situation est

ancienne et qu'elle persiste. ECP permet une plus grande discrimination de ces souches. Ces résultats révèlent bien le polymorphisme des souches, qui n'est pas aussi apparent avec les deux méthodes phénotypiques. Par ailleurs rappelons aussi que l'ECP reste la technique de premier choix, et qui est considérée comme l'étalon-or des méthodes de typage moléculaire [12,13].

L'existence de souches de génotypes différents exclut la dissémination d'une seule souche épidémique dans l'hôpital. Les résultats de notre étude rejoignent ceux de beaucoup d'enquêtes menées en milieux hospitaliers qui ont montré que le génie épidémique de K.p est limité. Il est habituel que dans un même service plusieurs Variétés de K.p coexistent. L'existence de flambée épidémique à K.p est exclue, celle de petits foyers est possible.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude permettent de fournir des données épidémiologiques sur *K.pneumoniae*, au niveau de l'hôpital universitaire de Constantine, ainsi que sur l'activité des β -lactamines, de quinolones et des aminosides, sur des souches présentant différents phénotypes de résistance. Cette résistance qui inquiète le biologiste et le clinicien est le reflet de la qualité de soins, en particulier de la politique d'isolement et d'antibiothérapie.

Aujourd'hui, il a été établi que dans beaucoup de cas, les processus de résistance sont coopératifs et interdépendants. Nous avons décrit le mécanisme de résistance qui est essentiellement du à la production de bêta-lactamases, ce problème peut-être pallié avec une utilisation prudente et avertie des antibiotiques ainsi que des mesures d'hygiène très strictes.

Enfin la comparaison des résultats des trois marqueurs épidémiologiques: biotype, antibiotype et pulsotype, nous permet de dire que le pulsotype est de loin le typage le plus discriminant.

REFERENCES

- [1]- Rahal K. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 2005; 4.
- [2]- Arlet G, Philippon A. 2003. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. Rev Franç Lab; 352: 41-55.
- [3]- Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. Risk Factors for development of Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Bacteria in Nonhospitalized Patients. Eur J Microbiol Infect Dis 2004; 23: 163-167.
- [4]- Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sotto A. Molecular Epidemiology of Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum beta-lactamases in a French Hospital. J Clin. Microbiol 2004; 42: 3805-3808
- [5]- Rice LB, Carias LL, Hujer AM. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy 2000; 44: 362-5.
- [6]- Bergogne-Bérézin E. Modes d'administration des antibiotiques et émergence de résistance chez les bacilles à Gram négatif. J Antibiotiques 2002; 4: 2836-2841.
- [7]- Stone PW, Gupta A, Loughrey M, Della-latta P, Cimiotti J, Larson E, Rubenstein D *et al*. Attributable cost and length of stay of an extended-spectrum beta-lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* outbreak in a neonatal intensive care unit. Infect Control Epidemiol 2003; 24: 601-606
- [8]- Sirot J, Nicolas-Chanoine MH, Chardon H, Avril JL, Cattoen C, Croix JC, Dabernat H, Fosse T, Ghnassia JC, Lecaillon E, Marmonier A. Susceptibility of Enterobacteriaceae to β -lactam agents fluoroquinolones: a 3-year survey in France. J Clin Microbiol Infect 2002; 8: 207-213.
- [9]- Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer H, Chanal C, Sirot D. CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-14 β -lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy 2002; 46: 534-7.
- [10]- Ducki S, Blech MF. Surveillance des bactéries multi résistantes en Lorraine: étude d'incidence multicentrique de trois ans. J Médecine et maladies infectieuses 2004; 34: 70-75.
- [11]- Pasteran Fernando G., Otaegui L., Guerriero L., Radice G., Maggiora R., Rapoport M., Faccione D., Di Martino A., Galas M. (2008): *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Aegentina. EID Journal Home. 14
- [12]- Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Rabino G, Eluk O, Kassis I, Braun E, Oren I. First outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella* in an Israeli university hospital. J Infection Control and Nosocomial Infection 2007; 24: 34-8.
- [13]- Bratu S, Landman D, Haag R. Rapid spread of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. J Arch Intern Med 2005; 165: 1430-5.

- [14]- Keynan y, Rubinstein E. (2007): The changing face of *Klebsiella pneumonia* infections in the community. *J.Antimicrob. Agents*.
- [15]- Winokur PL., Eidelstain MV., Stetsiouk O., Strachowski L., Blahova J., Reshedko GK., Craco MAT., Hollis RJ., Pfaller MA., Jones RN. (2000): Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 6: 103-108.
- [16]- Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in the United States. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, Apr 2004; 1295-1299.
- [17]- Singleton P. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.2005. Ed Dunno, 6^{ème} édition. Sciences SUP. 15: 464-467.
- [18]- Babini G S., Yuan M., Hall L and Livermore David M. (2003): Variable susceptibility to piperacillin/tazobactam amongst *Klebsiella* ssp.with extended-spectrum β -lactamase. *J Antimicrobiol Chemother* 51: 605-612.