

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



Année 2014



N°222

## MEMOIRE

DU DIPLOME DE MASTER DE MICROBIOLOGIE

FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

2013-2014

### Etude de la sensibilité des souches de *K. pneumoniae* isolées d'infections respiratoires basses 2012-2013

Présenté et soutenu le Lundi 25 Août 2014 à 11 heures

Par

**Mr Hamoud Ould Mohamdi Beibou**

---

#### MEMBRES DU JURY

<b><u>Président :</u></b>	Mr	Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur
	Mr	Gora	MBAYE	Maître de Conférences Agrégé
	Mr	Babacar	MBENGUE	Maître Assistant

<b><u>Directeur mémoire :</u></b>	Mr Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur
-----------------------------------	---------------------	------	------------

<b><u>Co-directeur</u></b>	Mr Abdoulaye	SECK	Assistant
----------------------------	--------------	------	-----------

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
<b>Première partie: Revue de la littérature</b>	
I. Généralités sur les infections respiratoires basses .....	2
I.1 Définition .....	2
I.2 Les Différents types d'infections respiratoires basses .....	3
I.2.1 Les Atteintes Bronchiques .....	3
I.2.2 Les Atteintes pulmonaires.....	4
II. Généralités sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	5
II.1 Historique .....	5
II.2 Habitat .....	5
II.3 Caractères bactériologiques.....	5
II.4 Pouvoir pathogène.....	6
III. Généralités sur les antibiotiques .....	6
III.1 Définition.....	6
III.2 Classification .....	6
III.3 Modes et Mécanismes d'action .....	7
III.3.1 Les Béta-lactamines .....	7
III.3.2 Les Aminosides.....	7
III.3.3 Les Quinolones .....	7
III.4 La résistance bactérienne.....	8
III.4.1 Les différents types de résistance .....	8
III.4.2 Le Support génétique .....	9
III.4.3 Les mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	10

## Deuxième partie: Travail expérimental

I.	Cadre d'étude.....	11
II.	Population d'étude.....	11
III.	Matériel et méthodes.....	11
III.1	Matériel.....	11
III.2	Méthodologie.....	12
III.2.1	Ré-identification des souches.....	12
III.2.2	Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	13
IV.	Résultats.....	14
IV.1	Résultats du contrôle de qualité.....	14
IV.1.1	Contrôle de stérilité.....	14
IV.1.2	Contrôle d'efficacité.....	14
IV.2	Résultats du CQI de la souche de référence.....	15
IV.3	Résultats de la sensibilité des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	16
V.	DISCUSSION.....	18
VI.	RECOMMANDATIONS.....	20
	CONCLUSION.....	21

## **Liste des Abréviations**

<b>ADH</b>	: Arginine Di-hydrolase
<b>AM</b>	: Ampicilline
<b>AN</b>	: Amikacine
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>ATM</b>	: Aztreonam
<b>BLSE</b>	: Béta-lactamase à Spectre élargi
<b>BPCO</b>	: Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
<b>CI</b>	Contrôle Interne
<b>CIP</b>	: Ciprofloxacine
<b>CLED</b>	: Cystine Lactose Electrolyte Deficient
<b>CQI</b>	: Contrôle de Qualité Interne
<b>CRO</b>	: Ceftriaxone
<b>CTX</b>	: Cefotaxime
<b>CXM</b>	: Céfuroxime
<b>EUCAST</b>	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FEP</b>	: Cefepime
<b>FOX</b>	: Céfoxitine
<b>GEN</b>	: Gentamycine
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Sulfure d'Hydrogène
<b>IPM</b>	: Imipenème
<b>IRB</b>	: Infection respiratoire basse
<b>MGY</b>	: Milk Glucose Yeast
<b>MH</b>	: Muller Hinton
<b>NA</b>	: Acide Nalidixique
<b>NOR</b>	: Norfloxacine
<b>ODC</b>	: Ornithine décarboxylase
<b>OFX</b>	: Ofloxacine
<b>PDA</b>	: Phénylalanine désaminase
<b>PEF</b>	: Pefloxacine
<b>pH</b>	: Potentiel d'Hydrogène
<b>PIP</b>	: Pipéracilline
<b>PLP</b>	: Protéine liant la Pénicilline
<b>TCC</b>	: Ticarcilline/Acide Clavulanique
<b>TDA</b>	: Tryptophane désaminase
<b>TIC</b>	: Ticarcilline
<b>TM</b>	: Tobramycine
<b>TZP</b>	: Pipéracilline/Tazobactam
<b>VP</b>	: Voges Proskauer

## **Liste des Tableaux**

Tableau I: Liste des Antibiotiques étudiés.....	13
Tableau II: Résultats des tests d'efficacité des milieux d'isolement.....	14
Tableau III: Résultats du contrôle de qualité interne.....	15
Tableau IV: Profils de résistance des souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées d'IRB.....	16
Tableau VI: Profils de résistance aux bêta-lactamines. ....	17
Tableau VII: Profils de résistance aux quinolones. ....	17
Tableau VIII: Profils de résistance aux aminosides.....	17

## **Liste des Figures**

Figure 1 : Sièges des infections du tractus respiratoire.....	2
---	---

## Remerciements

*À notre maître, Président de Jury et Directeur de mémoire*

**Le Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE**

*Vous nous faites un très grand honneur de présider le jury de notre mémoire.*

*Votre simplicité, votre sympathique amabilité, vos qualités scientifiques et humaines forcent l'admiration de tous vos étudiants et font de vous un modèle.*

*Nous avons été séduits et profondément marquée par la compétence avec laquelle vous avez toujours su mener la transmission de vos solides connaissances.*

*Nous vous prions, cher maître et professeur, d'accepter notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements.*

*À notre maître et juge*

**Le Professeur GORA MBAYE**

*Nous sommes très sensible au grand honneur que vous nous faites en acceptant spontanément de siéger dans notre jury de mémoire.*

*Votre simplicité, votre inébranlable disponibilité, votre générosité, vos qualités humaines et votre volonté pédagogique de transmettre votre savoir avec clarté, amabilité et chaleur expliquent l'admiration que nous éprouvons à votre égard.*

*Nous vous prions de croire en notre reconnaissance et notre profonde gratitude.*

*À notre maître et juge*

**Le Docteur Babacar MBENGUE**

*Nous sommes très sensible au grand honneur que vous nous faites en acceptant spontanément de siéger dans notre jury de mémoire.*

*Votre simplicité, votre inébranlable disponibilité, votre générosité, vos qualités humaines et votre volonté pédagogique de transmettre votre savoir avec clarté, amabilité et chaleur expliquent l'admiration que nous éprouvons à votre égard.*

*Nous vous prions de croire en notre reconnaissance et notre profonde gratitude*

*À notre maître et Codirecteur de mémoire*

**Le Docteur Abdoulaye SECK**

*Nous sommes très fère du grand honneur que vous nous faites en consentant sans hésitation, malgré vos multiples occupations, de porter un regard critique sur ce travail.*

*Votre générosité, votre curiosité, votre humanisme, votre esprit d'ouverture et vos qualités de pédagogie font de vous un maître exemplaire d'un abord facile et plaisant.*

*Permettez-nous, cher maître et professeur, de vous exprimer notre sincère admiration, notre respect et notre profonde gratitude.*

## INTRODUCTION

Les infections respiratoires basses constituent environ le tiers de l'ensemble des infections respiratoires. L'étiologie primaire des infections respiratoires est le plus souvent virale [25] et l'infection bactérienne survient généralement après, d'où la notion de surinfection.

Les infections respiratoires constituent un problème majeur de santé publique, particulièrement dans les pays en voie de développement en dépit des progrès de l'antibiothérapie.

Au niveau mondial, les infections respiratoires aiguës sont les causes majeures de morbidité et de mortalité.

Ces pathologies sont souvent traitées de manière empirique avec une antibiothérapie qui ne tient pas toujours compte des données locales, avec surtout l'absence de demande d'un diagnostic bactériologique par les cliniciens.

Parmi les pathogènes mis en cause dans les infections respiratoires basses, *Klebsiella pneumoniae* occupe une place importante, surtout dans les pneumonies nosocomiales avec une mortalité d'environ de 50% [12]. Cette mortalité est surtout accentuée avec l'apparition de souches multi-résistantes et décrites au cours des dernières années [1, 30].

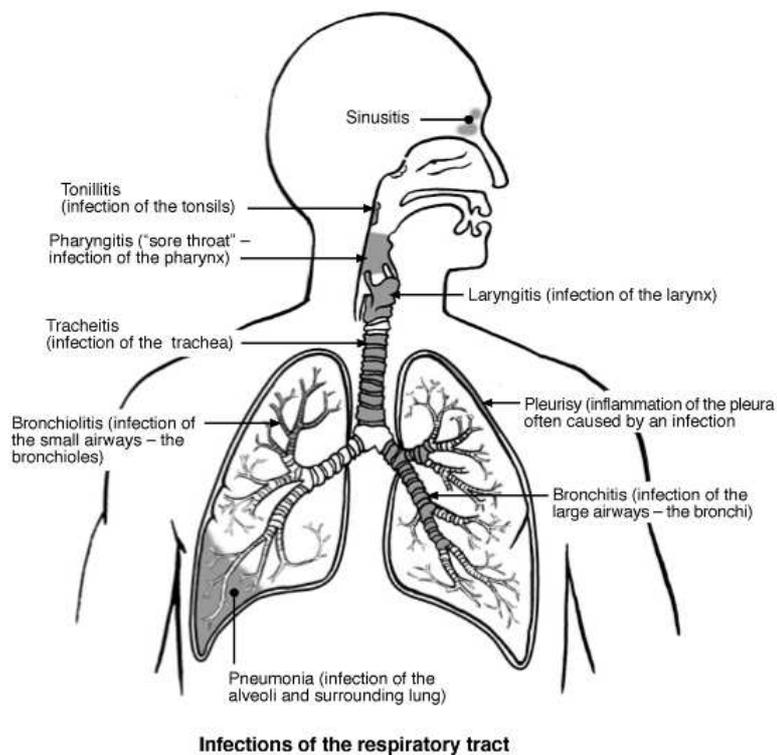
C'est dans ce contexte que nous avons mené cette étude dont l'objectif était d'étudier la sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections respiratoires basses.

# I. GENERALITES SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES BASSES

## I.1 Définition

Les infections respiratoires basses regroupent un ensemble de maladies respiratoires sous-glottique aiguës qui se caractérisent par :

- une toux associée immédiatement ou secondairement à une expectoration
- au moins un signe fonctionnel physique orientant vers une atteinte respiratoire basse : dyspnée, douleur thoracique, sifflement, signes auscultatoires récents en foyer ou diffuse
- au moins un signe général suggérant une infection : fièvre, sueur, céphalées, myalgies, arthralgies, mal de gorge ou rhume (*Figure 1*).



***Figure 1 : Sièges des infections du tractus respiratoire.***

## **I.2 Les Différents types d'infections respiratoires basses**

Les infections respiratoires basses peuvent avoir soit une localisation bronchique, soit une localisation pulmonaire soit les deux en même temps.

### **I.2.1 Les Atteintes Bronchiques**

#### ***I.2.1.1 La bronchite aiguë***

La bronchite aiguë est une maladie caractérisée par une inflammation des bronches et bronchioles d'apparition aiguë. D'origine généralement virale, elle se complique parfois de surinfections bactériennes qui nécessitent le recours à l'antibiothérapie [22]. Le diagnostic est clinique et l'évolution chez le sujet sain est en général favorable sans traitement [3].

Elle se caractérise par une recrudescence saisonnière (automne-hiver), par l'existence de co-facteurs aggravants [tabagisme, polluants atmosphériques], par sa survenue fréquente dans un contexte épidémique [grippe, principalement], et par une évolution spontanément bénigne dans l'immense majorité des cas [34].

#### ***I.2.1.2 La bronchite chronique***

La bronchite chronique est une inflammation des bronches, qui se définit par une toux productive [avec crachats] tous les matins pendant au moins trois mois de suite dans l'année et au moins deux années consécutives, sans autre cause identifiée [22].

Il est habituel d'en distinguer deux variétés :

- La bronchite chronique non obstructive : maladie des grosses bronches, non dyspnéisante, susceptible de régression sous l'effet du traitement ;
- La bronchite chronique obstructive : maladie des petites bronches distales, associant dyspnée et troubles des échanges gazeux pour aboutir à plus ou moins long terme à l'insuffisance respiratoire chronique et à un emphysème centrolobulaire [22].

#### ***I.2.1.3 La broncho-pneumopathie chronique obstructive***

La BPCO est caractérisée par une obstruction lente et progressive des voies aériennes et des poumons, associée à une distension permanente des alvéoles pulmonaires avec destruction des parois alvéolaires. La BPCO est caractérisée par la diminution non complètement réversible des débits expiratoires. Elle est classiquement associée à la bronchite chronique et à l'emphysème [31,32].

## **I.2.2 Les Atteintes pulmonaires**

### ***I.2.2.1 Les pneumonies***

Le terme pneumonie est le plus adéquat pour désigner l'atteinte infectieuse du poumon profond. Il arrive qu'on le substitue par abus de langage à celui de pneumopathie. Les pneumopathies englobent l'ensemble des pathologies pulmonaires infectieuses et non infectieuses [18].

Une pneumonie est donc une inflammation du parenchyme pulmonaire avec remplissage de l'espace alvéolaire par un exsudat, des cellules inflammatoires et de la fibrine. Elle est le plus souvent, due à un agent infectieux (bactéries ou virus) mais elle peut aussi être due à l'inhalation de produits toxiques ou à un traumatisme thoracique.

Les pneumopathies peuvent avoir des origines et des présentations cliniques multiples, on peut rencontrer :

#### ☞ Des pneumonies infectieuses

Les pneumonies infectieuses sont le plus souvent bactériennes ou virales, plus rarement mycosique ou parasitaire sur terrain immunodéprimé. Elles peuvent être communautaires, nosocomiales, opportunistes ou d'origine digestive [2].

#### ☞ Des pneumonies interstitielles

La pneumonie interstitielle est une infiltration de charpente conjonctive du poumon et touche le plus souvent les espaces alvéolaires. Elles peuvent également concerner les voies aériennes et/ou les vaisseaux pulmonaires [20].

#### ☞ Des pneumonies d'hypersensibilité

Les pneumopathies d'hypersensibilité sont provoquées par une hypersensibilité à l'inhalation de poussières organiques. Les particules sont suffisamment fines pour atteindre les alvéoles et provoquer une réponse immune exagérée et une inflammation diffuse des petites voies aériennes et du parenchyme pulmonaire chez un malade probablement sensibilisé. Ces particules sont extrêmement nombreuses : champignons, bactéries, protozoaires, animales, insectes, produits chimiques de bas poids moléculaire.

### ***I.2.2.2 L'abcès pulmonaire***

L'abcès pulmonaire se forme dans le parenchyme pulmonaire et contient du matériel purulent. Il se forme par la suite de la nécrose de tissu pulmonaire. Il est causé par des bactéries aspirées du tractus gastro-intestinal ou de la cavité orale chez les personnes atteintes d'une maladie parodontale.

Les abcès pulmonaires peuvent aussi résulter d'une tumeur maligne, d'une tuberculose ou de diverses maladies parasitaires et fongiques [19].

Le tableau clinique peut aller d'une faible toux productive jusqu'à la maladie aigüe. La plupart du temps, le patient présente une fièvre et une toux productive qui montre des sécrétions nauséabondes, souvent teintées de sang. La quantité d'expectorations varie de moyennement abondante à très abondante. Une douleur pleurétique, la dyspnée, la faiblesse, l'anorexie et une perte de poids comptent parmi les autres symptômes possibles [33].

## **II. GENERALITES SUR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

### **II.1 Historique**

En 1875 Edwin Klebs (1834-1913), découvre pour la première fois la présence de bactéries dans les voies respiratoires de personnes qui sont décédées de pneumonie. Des travaux initiaux, identifiant deux causes bactériennes communes "*Streptococcus pneumoniae*" et "*Klebsiella pneumoniae*" ont été réalisés par Carl Friedländer en 1882 et Albert Fränkel en 1882 [11].

### **II.2 Habitat**

Ce sont des bactéries commensales ubiquitaires présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des Hommes et des animaux. Elles sont fréquentes dans les selles et peuvent être indicateurs d'une contamination fécale. Elles sont abondantes dans le sol, les eaux et sont des fixateurs de l'azote atmosphérique [7, 28].

### **II.3 Caractères bactériologiques**

*Klebsiella pneumoniae* se présente sous forme de bacille à Gram négatif, immobile capsulée. Elle forme, sur milieu solide, de grosse colonie muqueuses, luisantes. Elle exprime des antigènes K, capsulaires utilisables comme marqueurs épidémiologiques. Elle fermente le glucose par la voie du butan-2,3-diol avec production de gaz. Cette bactérie est ODC négative, ADH négative, TDA négative, PDA négative et VP positif [5].

## II.4 Pouvoir pathogène

*Klebsiella pneumoniae* est isolé principalement des infections urinaires ou respiratoires parfois compliquées de septicémies [16] surtout en milieu hospitalier ou elle serait responsable de 10% des infections nosocomiales [10].

*Klebsiella pneumoniae* possède plusieurs facteurs de virulence. On peut noter la présence de capsule qui confère à la bactérie un caractère invasif et le protège de la phagocytose [19].

## III. GENERALITES SUR LES ANTIBIOTIQUES

### III.1 Définition

En 1942, Waksman a défini les antibiotiques comme des substances chimiques, produites par des micro-organismes et capables, à faible concentration, d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes ou même de les détruire. Maintenant en bactériologie médicale, on préfère donc retenir une définition plus large : les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produit par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes.

### III.2 Classification

La classification des antibiotiques peut être basée sur le site d'action au niveau de la bactérie visée ou sur le processus physiologique visé [15].

Ainsi, distingue-t-on sommairement :

- Les antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne,
- Les antibiotiques actifs sur la membrane cytoplasmique,
- Les antibiotiques actifs sur des processus localisés dans le cytoplasme bactérien : synthèse protéique, réplication de l'ADN ou les deux.

A l'intérieur de chacun de ces groupes, la classification par famille est fondée sur la structure chimique des différentes molécules, à chaque famille correspond un mécanisme moléculaire spécifique

### **III.3 Modes et Mécanismes d'action**

#### **III.3.1 Les Bêta-lactamines**

Bactéricides, peu toxiques, les bêta-lactamines possèdent un noyau bêta-lactame nitré à quatre sommets et interfèrent avec la synthèse de la paroi bactérienne en inhibant la transpeptidation du peptidoglycane de la paroi [26, 23].

Les cibles des bêta-lactamines sont des protéines présentes sur la face externe de la membrane cytoplasmique et dénommées PLP (Protéines Liant la Pénicilline) ou PBP (Penicillin Binding Protein). Le nombre et la nature des PLP varient selon les espèces bactériennes et elles sont numérotées en fonction de leurs masses moléculaires décroissantes : PLP 1, PLP 2 etc.

Les bêta-lactamines sont essentiellement des bactéricides temps-dépendants. La plupart sont éliminées sous forme intacte par le rein d'où leur utilisation dans le traitement des infections urinaires.

#### **III.3.2 Les Aminosides**

Antibiotiques bactéricides à spectre étroit, les aminosides relèvent quasi exclusivement d'un usage hospitalier. Ils doivent être réservés aux infections sévères notamment bactériémiques et endocardiques et chez les malades agranulocytaires et/ou immunodéprimés [23, 29].

Ils agissent selon les étapes suivantes.

- Pénétration à travers la membrane externe des bactéries gram négatif à travers les porines
- Association avec un mécanisme de transport en deux phases. C'est un système irréversible contrairement à celui de la tétracycline ou de la plupart des métabolites.
- Liaison à la sous-unité 30S du ribosome : cela a pour résultat d'inhiber la synthèse protéique, essentiellement au niveau de l'étape d'initiation [15].

#### **III.3.3 Les Quinolones**

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques, constitués de deux noyaux à six sommets accolés. L'addition d'un atome de fluor en position six sur le noyau quinolone augmente très nettement l'activité contre les bactéries à gram négatif et a donné naissance à une série de nouveaux dérivés appelés les quinolones [26]. Leurs mécanismes d'action sont identiques [15].

Les quinolones entraînent une inhibition rapide de la synthèse de l'ADN par action sur des topo-isomérases bactériennes. Ces molécules traversent la paroi des bactéries, pénètrent dans le cytoplasme par diffusion passive et vont agir sur l'ADN gyrase (ou topo-isomérase II) et la topo-isomérase IV.

L'activité des quinolones est essentiellement bactéricide et concentration dépendante. Leur biodisponibilité orale est excellente.

### **III.4 La résistance bactérienne**

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multi résistantes. La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique.

Deux définitions de la résistance bactérienne aux antibiotiques peuvent être retenues:

- Une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration atteignable *in vivo*.
- Une souche est dite « résistante » lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce [15,35].

#### **III.4.1 Les différents types de résistance**

D'une manière générale, la résistance des bactéries aux antibiotiques est de déterminisme génétique. Elle est soit naturelle, soit acquise. Elle peut aussi être clinique [6].

##### ***III.4.1.1 La résistance naturelle***

La résistance naturelle d'une espèce ou d'un genre est une caractéristique propre, concernant l'ensemble des souches de l'espèce ou du genre. Elle est portée par un chromosome donc toujours transmissible à la descendance (transmission verticale), elle possède aussi un caractère permettant de définir le phénotype sauvage de l'espèce. La résistance naturelle aide à l'identification d'une espèce.

### ***III.4.1.2 La résistance acquise***

La résistance acquise, pour sa part ne concerne qu'une proportion plus ou moins importante des souches d'une espèce. Elle résulte d'une modification génétique par mutation ou par acquisition de plasmides ou transposons, (résistance extra chromosomique) transmissible horizontalement, parfois entre espèces différentes. Elle définit des phénotypes «résistants». Les résistances croisées s'expriment au sein d'une même classe d'antibiotiques et sont dues au même mécanisme de résistance.

### ***III.4.1.3 La résistance clinique***

Elle se traduit par l'échec thérapeutique. Plusieurs facteurs entrent en cause dans ce type de résistance :

- des facteurs environnementaux (cations, protéines inhibitrices etc.)
- la pharmacocinétique
- le choix judicieux de l'antibiotique
- les mécanismes développés par les bactéries.

## **III.4.2 Le Support génétique**

### ***III.4.2.1 Résistance chromosomique (résistance naturelle)***

Il peut s'agir d'une mutation ponctuelle dans un gène de résistance entraînant par exemple une hypersécrétion d'enzymes inactivant les antibiotiques ou dans un gène de structure qui modifie le spectre d'une enzyme. Une mutation se caractérise par la rareté, la spontanéité, la discontinuité, la spécificité, l'indépendance et la stabilité.

D'autre part, il peut être un remaniement du génome par l'insertion de séquences apportant un promoteur permettant d'exprimer des gènes silencieux ou alors de l'acquisition de fragments de chromosomes étrangers par transformation [6, 9, 15].

### ***III.4.2.2 Résistance extra-chromosomique (résistance acquise)***

L'information génétique est portée par des plasmides transférables à d'autres bactéries par conjugaison, par transduction ou par transformation.

L'ensemble de ces gènes peut être sur des fragments d'ADN appelés « transposons » qui peuvent s'intégrer soit dans des plasmides, soit dans le chromosome [6, 9, 15].

### III.4.3 Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Il existe plusieurs mécanismes:

- ✓ L'absence de pénétration de l'antibiotique par diminution ou suppression de la perméabilité pariétale ou membranaire.
  
- ✓ L'altération de la cible moléculaire soit par modification du site de fixation de la cible ou par dégradation enzymatique de cette cible. Dans certains cas, la cible peut disparaître ou être substituée par une autre molécule ; dans tous les cas l'antibiotique ne pourra pas se fixer.
  
- ✓ La sortie excessive de l'antibiotique hors de la bactérie va entraîner une concentration insuffisante de l'antibiotique dans la bactérie.
  
- ✓ L'inactivation enzymatique de l'antibiotique : celui-ci pourra être détruit par les bactéries soit par hydrolyse (pénicillinase, céphalosporinase, etc.) ou alors il peut être modifié dans sa structure chimique et c'est ce qui se passe avec les aminosides si la bactérie possède une acétylase, une adénylase ou une phosphorylase. Ces enzymes d'inactivation sont très nombreuses et il en existe pour la plupart des bactéries [15,35].

## **DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL**

### **I. CADRE D'ETUDE**

Cette étude rétrospective a été réalisée à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de Bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide le Dantec.

### **II. POPULATION D'ETUDE**

Notre étude portait sur vingt-cinq souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de divers prélèvements (Expectoration, Lavage Broncho-Alvéolaire et Aspiration Bronchique) chez des patients hospitalisés ou non à l'hôpital Aristide le Dantec ou à l'hôpital de Fann et présentant une infection respiratoire basse entre 2012 et 2013. Ces souches étaient conservées à – 20°C dans un bouillon de conservation à base de lait écrémé (MGY).

La souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche de contrôle durant notre étude.

### **III. MATERIEL ET METHODES**

#### **III.1 Matériel**

- Gélose MH
- Gélose CLED
- Milieu MGY
- Bouillon Thioglycolate
- Eau distillée
- Eau physiologique stérile
- Kit de Coloration de Gram
- Mini Galerie d'Identification
- Peroxyde d'hydrogène
- Disque d'oxydase
- Disques d'Antibiotiques
- Boîtes de Pétri de 90 mm
- Cryotubes
- Boîtes de rangement
- Embouts stériles

- Ecouvillons stériles
- Lames porte-objets
- Anses de platine calibrée
- Etuve à 37°C
- pH-mètre
- Autoclave
- Vortex
- Pipettes semi-automatiques
- Pince
- Microscope
- Pied à coulisse

## **III.2 Méthodologie**

### **III.2.1 Ré-identification des souches**

La première étape consistait à régénérer les souches. Nous avons sorti les Cryotubes contenant les souches de *Klebsiella pneumoniae* concernées par l'étude. Les tubes étaient par la suite ramenés à la température de la paillasse pendant une heure.

Un repiquage du milieu de conservation MGY était effectué dans du BT incubé à 37°C pendant 24 heures. Le lendemain un repiquage du BT était effectué sur gélose CLED puis incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Un second repiquage était effectué sur gélose MH à partir de la gélose CLED.

L'identification des souches a été réalisée sur la base des caractères cultureux, morphologique et biochimiques de *Klebsiella pneumoniae*.

### III.2.2 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des vingt-cinq souches de *Klebsiella pneumoniae* a été réalisée selon les recommandations de l'EUCAST avec la méthode de diffusion sur gélose (Tableau I).

**Tableau I: Liste des Antibiotiques étudiés**

NOMS	CODES	CHARGES ( $\mu\text{g}$ )	Valeurs Critiques	
			R	S
Acide Nalidixique	NA	30	$\leq 16$	$\geq 18$
Amikacine	AN	30	$\leq 13$	$\geq 15$
Aztreonam	ATM	30	$\leq 21$	$\geq 23$
Cefepime	FEP	30	$\leq 21$	$\geq 23$
Cefotaxime	CTX	30	$\square 18$	$\geq 18$
Céfoxitine	FOX	30	$\square 19$	$\geq 19$
Ceftriaxone	CRO	30	$\leq 20$	$\geq 22$
Céfuroxime	CXM	30	$\square 18$	$\geq 18$
Ciprofloxacine	CIP	5	$\leq 19$	$\geq 21$
Gentamycine	GEN	10	$\leq 14$	$\geq 16$
Imipenème	IPM	10	$\leq 16$	$\geq 21$
Norfloxacine	NOR	10	$\leq 19$	$\geq 21$
Ofloxacine	OFX	5	$\leq 19$	$\geq 21$
Pefloxacine	PEF	5	$\leq 17$	$\geq 20$
Pipéracilline/Tazobactam	TZP	30	$\leq 17$	$\geq 19$
Ticarcilline/Acide Clavulanique	TCC	75	$\square 23$	$\geq 23$
Tobramycine	TM	10	$\leq 14$	$\geq 16$

R : résistant

S : sensible

## IV. RESULTATS

### IV.1 Résultats du contrôle de qualité

#### IV.1.1 Contrôle de stérilité

Les tests de stérilité effectués ont démontré que les géloses et bouillons préparés étaient exempts de toutes souillures. Nous n'avons constaté aucune croissance bactérienne durant les tests.

#### IV.1.2 Contrôle d'efficacité

Les contrôles d'efficacité étaient positifs sur tous les milieuxensemencés (Cf. Tableau II).

**Tableau II: Résultats des tests d'efficacité des milieux d'isolement.**

Milieux	Souches	Résultats (Incubation à 37°C)
<b>Gélose MH</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance : <i>colonies blanches, lisses et plates avec 1 à 1,5 mm de diamètre</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CI	<i>colonies blanches, muqueuses et bombées avec 1,5 à 2 mm de diamètre</i>
<b>Gélose CLED</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance : <i>colonies blanches, lisses et plates avec 1 à 1,5 mm de diamètre</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CI	<i>colonies blanches, muqueuses et bombées avec 1,5 à 2 mm de diamètre</i>
<b>BT</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance : <i>Type respiratoire AAF</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CI	<i>Type respiratoire AAF</i>

## IV.2 Résultats du CQI de la souche de référence

La souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 nous a permis de valider notre technique d'antibiogramme et l'efficacité des disques d'antibiotiques. Toutes les valeurs de diamètre d'inhibition sont conformes aux intervalles de valeurs établis par l'EUCAST (Cf. Tableau III).

**Tableau III: Résultats du contrôle de qualité interne**

Antibiotiques (codes)	Valeurs critiques	Contrôle				Moyenne des contrôles
		1	2	3	4	
NA	22 - 28	24	24	24	24	<b>24</b>
AN	19 - 26	21	21	22	21	<b>21</b>
AMP	16 - 22	18	18	18	18	<b>18</b>
ATM	28 - 36	31	31	32	31	<b>31</b>
FEP	31 - 37	33	33	33	33	<b>33</b>
CTX	25 - 31	28	28	28	28	<b>28</b>
CAZ	23 - 29	26	26	26	26	<b>26</b>
CRO	29 - 35	31	31	31	31	<b>31</b>
CXM	20 - 26	23	23	23	23	<b>23</b>
CIP	30 - 40	33	33	33	33	<b>33</b>
GEN	19 - 26	24	24	24	24	<b>24</b>
IPM	26 - 32	30	30	32	30	<b>31</b>
NET	18 - 24	22	22	22	22	<b>22</b>
NOR	28 - 35	30	30	30	30	<b>30</b>
OFX	29 - 33	31	30	30	30	<b>30</b>
PIP	21 - 27	23	23	23	23	<b>23</b>
TZP	21 - 27	24	24	24	24	<b>24</b>
TIC	24 - 30	26	26	28	26	<b>27</b>
TCC	24 - 30	28	28	28	28	<b>28</b>
TOB	18 - 26	19	19	21	20	<b>20</b>

### IV.3 Résultats de la sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae*

La majorité des souches était sensible aux bêta-lactamines (> 80%), aux quinolones (60%), alors que pour les aminosides cette sensibilité était de 44% (Cf. Tableau IV).

Les souches dont les valeurs de diamètre d'inhibition étaient catégorisées intermédiaires sont classées résistantes

***Tableau IV: Profils de résistance des souches de K. pneumoniae isolées d'IRB.***

ANTIBIOTIQUES	PROFILS (en pourcentage %)	
	R	S
Ticarcilline/Acide Clavulanique	92	8
Pipéracilline/Tazobactam	40	60
Céfoxitine	0	100
Céfuroxime	12	88
Céfotaxime	12	88
Aztréonam	16	84
Ceftriaxone	8	92
Céfepime	12	88
Imipénème	0	100
Acide Nalidixique	12	88
Ciprofloxacine	12	88
Norfloxacine	20	80
Péfloxacine	16	84
Gentamicine	32	68
Amikacine	8	92
Tobramycine	44	56

La majorité des souches étaient de phénotype sauvage pour les bêta-lactamines (n=19), alors que trois souches avaient un profil de pénicillinase de haut niveau et trois souches présentaient une BLSE (Cf. Tableau VI).

Par rapport aux quinolones, la majorité des souches étaient de phénotype I (n=15), alors souches étaient de phénotype III et étaient de phénotype IV (Cf. Tableau VII).

Pour les aminosides, seules deux souches étaient de phénotype KTGANT (Cf. Tableau VII).

**Tableau V: Profils de résistance aux bêta-lactamines.**

Profils de résistance	Effectifs	Pourcentage (%)
Phénotype sauvage	19	76
Pénicillinase de Haut niveau	3	12
BLSE	3	12

**Tableau VI: Profils de résistance aux quinolones.**

Phénotype	Acide Nalidixique	Norfloxacin	Pefloxacin	Ciprofloxacine	Pourcentage
I	S	S	S	S	60
III	R	I/R	I/R	S	8
IV	R	R	R	R	12

**Tableau VII: Profils de résistance aux aminosides**

Phénotype	Gentamicine	Tobramycine	Amikacine	Enzyme	Pourcentage (%)
G	R	S	S	AAC(3)-I	12
KTG	R	R	S	ANT(2'')-I	8
KTGNt	R	R	S	AAC(3)-II	4
KTGANt	R	R	R	Imperméabilité Association d'enzyme	8

## V. DISCUSSION

Cette étude réalisée au laboratoire de Recherche et de Biotechnologie microbienne s'est déroulée en l'absence d'un contrôle métrologique des réactifs et appareils utilisés pour l'antibiogramme standard. Ceci par manque d'un service de métrologie bien équipé pour mener à bien ce contrôle métrologique.

Cependant, l'utilisation de la souche de contrôle *Escherichia coli* ATCC 25922 a permis de valider notre technique d'antibiogramme mais aussi les valeurs de diamètres d'inhibition observées avec les souches de *K. pneumoniae* minimisant ainsi l'absence de contrôles métrologiques.

Cette étude de sensibilité des souches de *K. pneumoniae* isolées d'IRB et conservées sur milieu MGY a permis de démontrer l'efficacité de ce milieu pour la conservation de cette bactérie. La ré-identification de ces souches a montré que tous les caractères cultureux et biochimiques ont été conservés avec l'utilisation de ce milieu de culture.

Aulet de Saab *et al* ont démontré que ce milieu permettait une bonne conservation des bactéries, même les plus exigeantes savoir *Haemophilus influenzae* [4].

Une étude réalisée à Dakar en 2013 [24] a montré que le milieu à base de Bouillon Cœur cervelle et de glycérol permettait une conservation satisfaisante des bactéries sans altération de leurs propriétés à basses températures.

Les résultats des tests de sensibilité ont montré une diversité au niveau des profils de résistance avec les familles d'antibiotiques habituellement retrouvées dans les algorithmes de traitement des IRA, à savoir les bêta-lactamines, les aminosides et les quinolones.

Face aux bêta-lactamines, *Klebsiella pneumoniae* produit naturellement une pénicillinase d'origine chromosomique [13], retrouvée chez la souche sauvage qui représentait 76% de nos souches.

Seules six souches n'étaient pas sauvages avec trois souches qui produisaient une pénicillinase de haut niveau (PHN) et trois souches étaient productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Ces profils montraient une bonne sensibilité des souches de *K. pneumoniae* isolées dans les IRB, ce qui permet d'utiliser dans le traitement une large gamme d'antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines.

Sur les souches de notre série, 60% étaient sensibles à l'association Pipéracilline/Tazobactam qui peut être une alternative pour le traitement contrairement à l'association Ticarcilline/Acide clavulanique qui était seulement active sur deux souches.

Cette efficacité de l'association Pipéracilline/Tazobactam sur celle de l'association Ticarcilline/Acide clavulanique a été décrite.

Le nombre de souches productrices de BLSE était faible (n = 3) dans notre série. Ce constat a été fait par Jacobs *et al* [14] sur une population de 438 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infection respiratoire avec un taux de 13%.

La totalité de nos souches était sensible à l'imipénème qui constitue une solution pour le traitement des trois souches productrices de BLSE. Cette absence de souche de *Klebsiella pneumoniae* résistante à l'imipénème a été rapportée par Cissé *et al* en 2013 [13] en étudiant l'étiologie des infections respiratoires hautes. En Algérie, Lagha *et al* ont rapporté un taux de 8% [17].

L'émergence de souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE isolées en pathologie respiratoire doit inciter à une surveillance continue de l'étiologie de ces pathologies vues la gravité et les complications qui peuvent découler d'une telle situation.

Concernant les quinolones, 60% de nos souches étaient sensibles à ces molécules. Cependant, les souches productrices de BLSE étaient toutes résistantes à cette famille d'antibiotiques. Cette production de BLSE par des souches de *Klebsiella pneumoniae* associée à une résistance aux quinolones a été aussi rapportée par Ko *et al* [27] sur des souches isolées d'infection communautaire.

Pour les aminosides, l'Amikacine était la molécule la plus active sur nos souches (92%). Même si on observe une augmentation de la résistance de ce germe avec cette molécule à Dakar [8].

## **VI. RECOMMANDATIONS**

A la suite de cette étude, quelques recommandations nous semblent nécessaires :

- L'utilisation de souche de contrôle pour valider la technique d'antibiogramme
- Surveillance continue de la résistance des pathogènes bactériens responsables d'infection respiratoire
- Inciter les cliniciens à réaliser des prélèvements bactériologiques avant toute antibiothérapie
- Etudier les mécanismes moléculaires des souches BLSE multi-résistantes

## CONCLUSION

Cette étude rétrospective sur la sensibilité des souches de *K. pneumoniae* isolées d'infection respiratoire basse a été menée à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de Bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide le Dantec entre 2012 et 2013.

Les infections respiratoires constituent l'une des plus fréquentes causes de consultation en pathologie humaine dans le monde.

Au total, vingt-cinq souches de *K. pneumoniae* ont été testées suivant les recommandations de l'EUCAST montrant une bonne sensibilité de ces germes vis-à-vis des antibiotiques testés par méthode de diffusion sur gélose.

Seules trois souches étaient productrices de BLSE et résistantes aux quinolones. Cependant, toutes les souches étaient sensibles à l'imipénème, ce qui constitue une alternative pour le traitement des souches multi-résistantes.

L'utilisation de souches de contrôle a été capitale dans la validation de la technique d'antibiogramme et du profil de résistance malgré l'absence de contrôle métrologique sur les appareils et réactifs de laboratoire utilisés pour la réalisation de l'antibiogramme

L'émergence de ces souches doit inciter à une surveillance continue des pathogènes bactériens responsables d'infection respiratoire et de réaliser les prélèvements à visée bactériologique par les cliniciens avant toute antibiothérapie.

Cette surveillance permettra à long terme d'établir des algorithmes de traitement sur la base des données locales.

Enfin, cette surveillance permettra de bien étudier les mécanismes moléculaires des souches multi-résistantes responsables d'infection respiratoire.

## Références bibliographiques

1. Antimicrobial resistance: global report on surveillance: World Health Organisation, 2014.
2. **Anglaret X et Mortier E.***Maladies infectieuses*. 3e. Paris : Estem, 2002. pp. 230-238.
3. **Aubrier, M, et al.***Traité de pneumologie*. 2e. s.l. : Flammarion, 2009. pp. 375-376.
4. **Aulet de Saab O C, de Castillo M C et de Ruiz Holgado A P.**A Comparative Study of Preservation and Storage of *Haemophilus influenzae*.*Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, 96 :583-586.
5. **Baudry C. et Brezellec H.***Microbiologie, Immunologie* : Wolters Kluwer France, 2006. pp. 17-23.
6. **Briand, M.Y.***Une histoire de la résistance aux antibiotiques A propos de six bactéries*. Paris : Harmattan, 2009. pp. 147-161.
7. **Brisse S et al.**Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization.*PLoS ONE* 2009, IV. e4982.
8. **Cissé, A.** Profil de sensibilité aux antibiotiques. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP , Thèse en Pharmacie 2012. N°43.
9. **Courvalin P et Leclercq R.***Antibiogramme*: ESKA, 2006. pp. 133-135.
10. **Denis F et M C Ploy.***Bacteriologie Médicale Techniques usuelles*. : Masson, 2007.
11. **Dworkin M et Falkow S.***Prokaryotes*. : Springer Science - Business Media, 2006. pp. 159-196. Vol. 6.
12. **Ellis, M.** *Infections Diseases of Respiratory tract*. s.l. : Cambridge University Press, 1998. ISBN 0-521-40554-8.
13. **Hammani A.** *Les inhibiteurs des bêta-lactamases*. : Medecine du maghreb, 1991.

14. **Jacobs E.** Susceptibility patterns of bacterial isolates from hospitalized patients with respiratory tract infections. *Int J Antimicrobial Agent*, 2009. 1, 33: 52-57.
15. **Jehl F. et al.** *De l'antibiogramme à la prescription*. 2e édition. Paris : Biomérieux, 2003. p. 136.
16. **Ko W-C, Patterson D L et Saguimeni Anthanasia J.** Community Acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Global difference patterns. *Emerging Infections Diseases* 2002; 8, 2: 160-166.
17. **Lagha , N, Abdelouahid, D E et Hassaine, Hafida.** First characterization of CTX-M-15 and DHA-1 beta-lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Laghout hospital, Algeria. *African J of Microbiol Research* 2014; 8:1221-1227.
18. **Leophonte P.** *Pneumonie*. Paris : John Libbey Eurotext, 2001. p. 246 pages. ISBN 2-7420-0275-8.
19. **Lewis S L et al.** *Soins infirmiers, Médecine Chirurgie*. Bruxelles : De Boeck, 2011. pp. 284-285. Vol. II. ISBN 978-2-8041-6619-9.
20. **Maitre, B, Salmeron, S et Valeyre, D.** *Pneumologie*. Paris : Lavoisier, 2013. p. 351. ISBN 978-2-257-70578-5.
21. **March C, Cano V et Moranta D.** Role of Bacterial Surface Structure on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PLOs One*, 2013, Vol. 8. e56857.
22. **Maitre, B, Salmeron, S et Valeyre, D.** *Pneumologie*. Paris : Lavoisier, 2013. p. 351. ISBN 978-2-257-70578-5.
23. **Molinier A et Massol J.** *Pathologie médicale et pratiques infirmières*. [éd.] Walters Kluwer. France : Lamarre, 2007. pp. 163-166. ISBN 978-2-7573-0074-9.
24. **Mouton Y et al.** *Antibiotiques, Antiviraux, Anti-infectieux*. Paris : John Libbey EUROTEX, 2000. p. 288.
25. **Ndour, N.** Etude de la viabilité des souches de référence utilisées dans le contrôle microbiologique des antimicrobiens. Dakar : UCAD, Juillet 2013. These pharmacie n°44.

- 26. Paba P, Farchi F et Mortati E.** Screening of respiratory pathogens by respiratory multi well (MWS] r-gene™ assay in hospitalized patients. . s.l. : *NewMicrobiologica*, 2014;37: 231-236.
- 27. Page CP, Curtis M J et Sutter M C.** *Pharmacologie Intégrée*. Paris : DeBoeck Supérieur, 1999. p. 246. ISBN : 2-7445-0015-1.
- 28. Paterson D L.** Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolate causing bacteremia. *Clinical Infections Diseases* 2000; 30. doi: 10.1086/313719.
- 29. Podschun R. et Ullman U.** *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing method and Pathogenicity factor. *Clinical Microbiol Rev.* 1998; XI, 4: 538-603.
- 30. Schaetter M, Medoff G et Eisentein BL.** *Microbiologie et pathologie infectieuses*. Paris : DeBoeck, 1999. p. 1000.
- 31. Sedlakova M H, Urbanek K et Vojtava V.** Antibiotic consumption and its influence on the resistance in *Enterobacteriaceae*. *BMC Research Notes* 2014; 1, 7: 454.
- 32. Similowski, Thomas .** *BPCO Bronchopneumopathie chronique obstructive*. : Elsevier Masson, 2008. ISBN 2-294-70189-4.
- 33. Similowski, Thomas, Muir, Jean Francois et Derenne, Jean Philippe.** *La bronchopneumopathie chronique obstructive*. Paris : John Libbey Eurotext, 2004. p. 3. ISBN 2-7420-0473-4.
- 34. Smeltzer, S et Bare, B.** *Soins infirmiers en médecine et en chirurgie, L'appareil respiratoire*. 3e. Bruxelles : De Boeck, 1994. p. page 106. Vol. I. ISBN 2-8041-1897-5.
- 35. Tattevin, Pierre.** *Infections respiratoires*. Paris : Estem, 1998. p. 25. ISBN 2-84371-017-0.
- 36. Yala , D, et al.** Résistance bactérienne aux Antibiotiques. *Médecine du Maghreb*. 2001, 91, pp. 13-14.