

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE 1995



THESE N° 226

ACINETOBACTER BAUMANNII :
Sensibilité aux antibiotiques de souches isolées
au bloc de réanimation respiratoire en 1993.

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présenté et soutenu publiquement le 8 Juin 1995 à Toulouse

par

Hélène RIVIÈRE

JURY

Président
Assesseurs

Professeur G. MICHEL
Professeur G. CHABANON
Madame M. ARCHAMBAUD
Docteur B. GEORGES

**A mes parents,
pour leur soutien constant et inconditionnel**

A ma famille

A mes amis.

UNIVERSITE DE LIMOGES**FACULTE DE PHARMACIE**

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur le Professeur DREYFUSS Gilles
Maître des conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE -
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :

POMMARET Maryse

A NOTRE PRESIDENT DE JURY DE THESE

Monsieur le professeur G. MICHEL

**Professeur des Universités (Bactériologie-Virologie)
Faculté des sciences pharmaceutiques de Toulouse.**

*Vous nous faites un grand honneur en acceptant la présidence du jury
de cette thèse.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre gratitude
et de notre profond respect.*

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le professeur G. CHABANON

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier, responsable du secteur de Bactériologie
au laboratoire de Bactériologie-Virologie au C.H.U.

de Toulouse Rangueil.

*Vous nous avez accueilli dans votre laboratoire durant six mois et pendant
l'élaboration de ce travail.*

Vous nous faites l'honneur de siéger à ce jury.

Nous tenons à vous exprimer notre respectueuse reconnaissance.

Madame M. ARCHAMBAUD

Maître de Conférence des Universités.

Praticien Hospitalier au laboratoire de Bactériologie-Virologie
au C.H.U. de Toulouse Rangueil.

Vous êtes à l'origine de ce travail.

*Nous vous remercions du temps que vous avez bien voulu nous consacrer
autant de fois qu'il nous a été nécessaire.*

*Vous avez su nous guider avec dynamisme et compétence en nous
accompagnant tout au long de l'élaboration de cette thèse.*

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde et sincère gratitude.

Monsieur le Docteur B. GEORGES

Praticien Hospitalier en Anesthésie Réanimation

au C.H.U. de Toulouse Rangueil.

*Nous sommes très honorés de l'intérêt que vous avez bien voulu accorder
à ce travail et par votre présence à ce jury de thèse.*

Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance.

A celles et ceux qui ont bien voulu participer à l'élaboration de cette thèse :

Madame le Docteur C. SUC :

Vous avez accepté de vous intéresser à ce travail et nous aider par vos avis et vos conseils. Veuillez trouver ici l'expression de nos remerciements.

Christophe :

Je te remercie pour ton aide précieuse et efficace.

le personnel du laboratoire de Bactériologie de Ranguel :

Merci pour avoir contribué avec tant de gentillesse à l'élaboration de ce travail.

les laboratoires MSD Chibret :

pour l'apport à la réalisation matérielle de cette thèse.

PLAN

INTRODUCTION

Première partie

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- I - Taxonomie
- II - Caractères d'identification
- III - Marqueurs épidémiologiques
- IV - Habitat
- V - Pouvoir pathogène
- VI - Sensibilité aux antibiotiques

Deuxième partie

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES D'ACINETOBACTER

BAUMANNII AU BLOC DE REANIMATION RESPIRATOIRE EN 1993

- I - Présentation de l'étude
- II - Matériel et méthodes
- III - Résultats
- IV - Discussion

CONCLUSION

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii est une espèce bactérienne ubiquitaire. Fréquemment rencontrée dans l'environnement hospitalier, c'est une bactérie pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales en particulier dans les services de réanimation.

L'utilisation croissante d'antibiotiques à large spectre a contribué à la sélection de souches multirésistantes. Le choix d'une antibiothérapie est alors devenu de plus en plus difficile, l'imipénème restant souvent le seul actif.

L'apparition au bloc de réanimation respiratoire (B.R.R.) de Ranguel de souches d'*Acinetobacter baumannii* présentant à l'antibiogramme standard, une sensibilité diminuée à l'imipénème, a motivé notre étude.

A l'aide de deux techniques de détermination des concentrations minimales inhibitrices, nous avons tenté de préciser l'activité de plusieurs antibiotiques sur ces souches mais également sur celles isolées pendant la même période qui restaient sensibles à l'imipénème. Enfin il nous a paru intéressant de compléter notre travail par l'étude de l'effet bactériostatique de l'association de deux antibiotiques sur certaines de ces souches.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I TAXONOMIE

I-1) Famille et Genre

Le Genre *Acinetobacter* est rattaché à la Famille des Neisseriaceae comprenant les Genres *Kingella*, *Moraxella* et *Neisseria* dont il se différencie par son absence d'oxydase et de nitrate réductase. En 1991, des études réalisées sur les ARN ribosomiaux ont mis en évidence l'hétérogénéité génétique de la Famille des Neisseriaceae conduisant au regroupement des Genres *Acinetobacter* et *Moraxella* dans la super Famille des Moraxellaceae [48].

Les bactéries du Genre *Acinetobacter* sont des coccobacilles à Gram négatif, immobiles, aérobies stricts, catalase +, oxydase - et ne réduisant pas les nitrates.

I-2) Espèces du Genre *Acinetobacter*

I-2-1) Historique

En 1954, Brisou et Prévot [38] ont créé le Genre *Acinetobacter*.

En 1968, Baumann et coll. [5] ont publié l'étude d'une taxonomie basée principalement sur des propriétés nutritionnelles et ont défini deux groupes A et B (sept phénotypes de A1 à A3 et de B1 à B4). Cependant les auteurs n'ont pas réussi à déterminer des caractères permettant une identification sans ambiguïté.

En 1980, dans "Approved Lists of Bacterial Names", sont décrites deux espèces (appelées biovar) classées selon l'oxydation ou non du glucose :

Acinetobacter calcoaceticus et *Acinetobacter lwoffii*.

En 1984, dans le "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" on parle d'une espèce unique : *Acinetobacter calcoaceticus* bien qu'une hétérogénéité biochimique et génétique soit mentionnée.

I-2-2) Classification actuellement en vigueur

Depuis 1986, la taxonomie du Genre *Acinetobacter* a considérablement changé grâce aux travaux de Bouvet et Grimont [8]. Par la technique d'hybridation ADN-ADN, ils ont défini douze espèces génomiques appelées genospecies numérotées de 1 à 12.

En 1989 Tjernberg et Ursing [59] ont présenté trois nouveaux genospecies de 13 à 15 alors que la même année, Bouvet et Jeanjean décrivaient cinq nouveaux groupes de 13 à 17 [10]. Le genospecies 13 de Bouvet, aussi appelé B-J 13, semble correspondre au genospecies 14 décrit par Tjernberg.

Pour permettre une identification pratique des genospecies, Bouvet et Grimont [8] ont proposé 28 tests biochimiques qui sont de quatre types :

- la production d'acide à partir du glucose ;
- l'hydrolyse de la gélatine ;
- l'utilisation de certains substrats comme seule source de carbone et d'énergie ;
- la croissance à 37°, 41° et 44°.

De cette manière 11 genospecies ont pu être identifiés sans ambiguïté parmi eux sept ont reçu des noms d'espèces.

Cinq nouveaux noms ont été attribués :

Genospecies (Gsp) 2 : *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*)

Gsp 4 : *Acinetobacter haemolyticus* (*A. haemolyticus*)

Gsp 5 : *Acinetobacter junii* (*A. junii*)

Gsp 7 : *Acinetobacter johnsonii* (*A. johnsonii*)

Gsp 12 : *Acinetobacter radioresistens* (*A. radioresistens*)

Les deux autres noms attribués étaient déjà connus :

Gsp 1 : *Acinetobacter calcoaceticus* (*A. calcoaceticus*)

Gsp 8 : *Acinetobacter lwoffii* (*A. lwoffii*).

II CARACTERES D'IDENTIFICATION

II-1) Caractères cultureux

II-1-1) Les milieux usuels

Les bactéries du Genre *Acinetobacter* sont peu exigeantes, elles se développent facilement sur les milieux classiques : gélose au sang et Mueller Hinton, sur milieux différentiels tels qu'E.M.B.(Eosine Bleu de Méthylène), Drigalski et Mac Conkey.

Récemment un nouveau milieu sélectif et différentiel a été décrit : Leeds *Acinetobacter* Medium (L.A.M.) ; il permet d'isoler les souches d'*Acinetobacter* recueillies dans l'environnement ou dans des prélèvements cliniques. Les concentrations d'antibiotiques composant ce milieu ont été déterminées à partir des valeurs des C.M.I. obtenues sur un panel de souches [29].

II-1-2) Morphologie et aspect des colonies

Les *Acinetobacter* sont des bacilles ou coccobacilles, Gram négatif, associés par deux, polymorphes ayant des formes filamenteuses de longueur variable dans les cultures âgées.

Les colonies d'*Acinetobacter* se développent en 24 heures sur milieux usuels gélosés, elles ont 2 à 3 mm de diamètre, elles sont convexes, luisantes, blanchâtres et parfois hémolytiques sur gélose au sang. On dit que ces bactéries possèdent une odeur particulière de "crevette pas fraîche". En milieu liquide le trouble est homogène avec une collerette en surface.

II-1-3) La température de croissance

La température de croissance est un caractère complémentaire utilisé pour la différenciation des espèces d'*Acinetobacter*. La température optimale de croissance est de 37° sauf pour *A. johnsonii* et quelques espèces gsp 11 et 13 qui ne se développent plus à 37° mais entre 30 et 35°. A 41° et à 44° certaines espèces se développent encore (tableau n°1, p 12).

II-2) Caractères biochimiques

Après avoir défini, en 1986, les 28 caractères biochimiques permettant l'identification des genospecies, Bouvet et Grimont ont proposé, en 1987, un tableau simplifié d'identification avec seulement 16 tests choisis parmi les 28 (tableau n°1, p 12).

Identification simplifiée des espèces nommées d'*Acinetobacter*

	<i>A. calco-</i> <i>aceticus</i>	<i>A. baum-</i> <i>annii</i>	<i>A. haemo-</i> <i>lyticus</i>	<i>A.</i> <i>junii</i>	<i>A.</i> <i>johnsonii</i>	<i>A.</i> <i>lwoffii</i>
Croissance à 44°C	-	+	-	-	-	-
à 41° C	-	+	-	+	-	-
à 37° C	+	+	+	+	-	+
Production d'acide à partir du glucose	+	+	d	-	-	d
Hydrolyse de la gélatine	-	-	+	-	-	-
Utilisation du :						
DL-lactate	+	+	-	+	+	+
DL-4 aminobutyrate	+	+	+	d	d	d
<i>Trans</i> -Aconitate	+	+	d	-	-	-
Citrate	+	+	+	d	+	-
Glutarate	+	+	-	-	-	-
Aspartate	+	+	d	d	d	-
Azolate	+	+	-	-	-	+
β -Alanine	+	+	-	-	-	-
L-histidine	+	+	+	+	-	-
D-malate	-	+	+	+	d	d
Malonate	+	+	-	-	d	-
Histamine	-	-	-	-	-	-
L-phénylalanine	+	d	-	-	-	-
Phénylacétate	+	d	-	-	-	+
γ GT	+	+	-	-	-	-
β xylosidase	-	+, e	d	-	-	-, e

Symboles : e = il existe des exceptions, d = caractère variable

Tableau n°1 [9]

Remarque : la γ GT et la β xylosidase sont deux caractères proposés parmi les 28 tests mais ne figurent pas parmi les 16 tests choisis par Bouvet ; cependant ils peuvent être utilisés en pratique courante pour différencier *A. baumannii* et *A. calcoaceticus* d'*A. lwoffii* [4].

II-3) Limites de l'identification biochimique

Les caractères biochimiques ne permettent pas une identification parfaite des espèces :

- Gerner-Smidt [22] a testé la fiabilité de l'identification simplifiée proposée par Bouvet :

Sur 198 souches appartenant aux genospecies (n° de 1 à 15) définis par Tjernberg, 181 représentaient les groupes de 1 à 12 ; parmi elles 78% ont été bien identifiées, 2,2% mal identifiées et 19,8% n'ont pu être identifiées. La plupart des problèmes ont été rencontrés pour différencier les genospecies 1 (*A.calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 et 13. En effet ces espèces génomiques ont des caractères biochimiques similaires. Gerner propose d'utiliser le terme de complexe *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* pour désigner ces quatre genospecies.

- En 1990, avec d'autres collaborateurs, Gerner Smidt [20] a décrit un nouveau schéma simplifié d'identification comprenant 14 tests à la fois biochimiques et de sensibilité à la pénicilline G et au chloramphénicol. Mais leur étude n'a pas permis de distinguer les espèces du complexe *A. calcoaceticus-A.baumannii* et la différenciation des genospecies 8, 9 et 15 n'a pas été possible.

- Bouvet et Grimont [9] évoquent le problème de distinction entre *A.lwoffii* et *A. gsp 9*. En effet ces deux espèces ont des caractères phénotypiques semblables, certaines de ces souches peuvent être différenciées par la température de croissance, les autres sont classées : *A. lwoffii* - *A.gsp 9* atypiques.

- L'utilisation de la température de croissance est un caractère discriminant mais il faut disposer d'étuves très précises (à 37° et à 41° exactement) ce qui n'est pas toujours réalisable. De plus on a constaté que la température de croissance était influencée par le milieu utilisé.

Les remaniements de la taxonomie du Genre *Acinetobacter* et les problèmes d'identification des différentes espèces ont conduit Weaver et Actis à publier une

lettre [67], en 1994, faisant le point sur cette nouvelle taxonomie et plus particulièrement :

-concernant les dénominations des espèces.

Certains noms étaient déjà employés dans des classifications précédentes. Par exemple, auparavant *A. calcoaceticus* désignait l'ensemble du Genre *Acinetobacter*, aujourd'hui il ne désigne plus que le genrespecies 1.

A. baumannii était autrefois appelé *A. calcoaceticus* variété *anitratus*, désormais *A. baumannii* et *A. calcoaceticus* sont deux espèces différentes.

-Enfin à propos des difficultés pour différencier les espèces par les caractères biochimiques, Weaver et Actis proposent que les auteurs des publications précisent exactement les tests utilisés dans leur méthode.

Sasal et coll. [49] se posent la question de la nécessité d'identifier les espèces d'*Acinetobacter* en laboratoire clinique. On pourrait utiliser des tests complémentaires simples tels que la production d'acide à partir du glucose et la croissance à 44° pour identifier l'espèce principale : *A. baumannii*. Cependant en épidémiologie la mise en oeuvre de méthodes performantes d'identification et de typage est nécessaire afin de mieux cerner les épidémies hospitalières.

III MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES

Devant l'importance des infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii*, les bactériologistes se sont intéressés aux techniques permettant de typer les souches au sein de cette espèce et de les différencier des autres espèces du Genre *Acinetobacter*. Il n'y a pas de schéma de méthodes de typage réellement défini pour faire une étude épidémiologique. Mais il faut distinguer deux groupes de marqueurs :

-les marqueurs phénotypiques classent les souches selon les caractères qu'elles expriment ;

-les marqueurs génotypiques permettent de différencier les souches par les techniques de biologie moléculaire.

III-1) Marqueurs phénotypiques

III-1-1) Antibiotypie

L'antibiotypie permet de classer les souches d'après leurs profils de résistance aux antibiotiques. Dans l'étude de Joly Guillou et coll. [33], onze antibiotiques (cinq β -lactamines, cinq aminosides et une quinolone) ont été testés par méthode de diffusion sur milieu gélosé de Mueller Hinton.

Les diamètres d'inhibition sont comparés aux valeurs publiées par le Comité Français de l'Antibiogramme. Les souches sont classées en trois catégories : sensible, intermédiaire ou résistante et affectées à un profil de résistance.

L'antibiotypie est le premier marqueur réalisé en routine, il permet également de détecter les nouveaux phénotypes de résistance et constitue parfois le point de départ pour la recherche des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques.

III-1-2) Biotypie

Parallèlement à l'identification biochimique, Bouvet et Grimont [9] ont proposé, en 1987, un système de biotypage des souches d'*Acinetobacter baumannii* basé sur l'utilisation de six différentes sources de carbone sous forme d'auxanogramme (galeries Api 50AA, 50AO).

Les substrats utilisés sont : le lévulinate, le citraconate, la L-phénylalanine, le phénylacétate, le 4 OH benzoate et le L-tartrate. Le résultat est obtenu en 48 heures après incubation à 30°C.

Dans cette étude, le biotypage a permis de distinguer, à partir de 100 souches d'*A. baumannii*, 18 biotypes (numérotés de 1 à 18). Une autre publication plus récente [11] décrit le biotype 19.

Dans les différents travaux de biotypage, la majorité des biotypes est représentée par les biotypes 1, 6 et 9 : les numéros 1 et 6 prédominants dans les infections respiratoires ; le biotype 9 est surtout retrouvé dans les hémocultures et on a constaté qu'il est plus résistant aux antibiotiques [51].

III-1-3) Lysotypie

Cette méthode, mise au point par Vieu et coll. en 1970, est basée sur la sensibilité d'*Acinetobacter* à deux systèmes complémentaires de phages spécifiques. Le premier comprend 21 bactériophages et permet de distinguer 112 lysotypes ; le deuxième a conduit à subdiviser les souches non typables en 20 sous types et un groupe de souches insensibles.

En 1990, Joly Guillou et coll. [33] ont lysotypé 117 souches d'*Acinetobacter*. 78 étaient lysotypables, 6 avaient un lysotype dit atypique et 33 n'étaient pas lysotypables. Parmi ces 117 souches, 100 étaient des *Acinetobacter baumannii* comprenant 75 souches typables dont la plupart appartenait aux lysotypes 17 et 124.

La lysotypie est une technique délicate car de nombreux facteurs peuvent influencer les résultats. Elle est réalisée par très peu de laboratoires qui doivent posséder la batterie de bactériophages nécessaire. De plus le pourcentage de

souches lysotypables est encore insuffisant mais pourra augmenter si d'autres phages sont découverts.

III-1-4) Profils électrophorétiques

- des protéines d'enveloppe de la membrane externe.
- des estérases : différenciation en zymotypes [54].
- des lipopolysaccharides [3].

III-1-5) Autres méthodes phénotypiques

La sérotypie est basée sur la détection sérologique des différences de composition antigénique de la paroi bactérienne. Traub [60], depuis 1989, a développé des systèmes de sérotypages pour *Acinetobacter baumannii* et *Acinetobacter gsp 3* mais les réactions croisées sont nombreuses.

III-1-6) Intérêt des méthodes phénotypiques

Pour Bouvet et coll. [11], le biotypage et le profil électrophorétique des protéines d'enveloppe de la membrane externe ont permis le typage de toutes les souches de leur étude, ce que ne permettait pas le lysotypage.

En 1993, Dijkshoorn [17] a pu comparer quatre méthodes de typage : le biotypage, l'électrophorèse des protéines, l'antibiogramme et le ribotypage, en identifiant 25 souches responsables d'épidémies dans cinq centres hospitaliers. Avec le biotypage et l'antibiogramme, des variations ont été observées pour quatre souches. Cela nous suggère donc que ces deux méthodes sont sans doute moins fiables que l'électrophorèse des protéines et le ribotypage.

Cependant malgré les performances de certaines techniques de typage, il est toujours préférable de mettre en oeuvre plusieurs méthodes lorsqu'on entreprend une étude épidémiologique.

III-2) Marqueurs génotypiques

III-2-1) Profil plasmidique

Koprec et coll. [41] ont démontré l'intérêt de l'utilisation du profil plasmidique dans les études épidémiologiques concernant le Genre *Acinetobacter*. C'est une méthode de typage simple et reproductible ayant un bon pouvoir discriminant ; cependant les plasmides ont des structures génétiques instables et toutes les souches n'en possèdent pas.

III-2-2) Ribotypage

Le ribotypage est une méthode qui permet l'analyse des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomaux.

Cette technique est particulièrement utile pour distinguer les quatre espèces du complexe *A. calcoaceticus-A. baumannii* ; Gerner [19] a utilisé pour cela trois enzymes de restriction (*Eco* RI, *Cla* I et *Sal* I).

Dans une autre étude publiée en 1993, il a démontré la diversité considérable de ribotypes obtenus à partir du complexe *A. calcoaceticus-A. baumannii* avec *Eco* RI [21]. Il a ainsi découvert deux nouveaux ribotypes, jusque là inconnus et apparentés au complexe.

En conclusion de cette étude, Gerner propose d'utiliser un seul nom pour désigner l'ensemble du complexe *A. calcoaceticus-A. baumannii* qui contient plus de quatre espèces, ce serait *Acinetobacter calcoaceticus*.

En 1994, Sire [54] a comparé le ribotypage à deux autres méthodes phénotypiques : électrophorèse des estérases et biotypage. Sur 31 souches appartenant à deux biotypes 9 et 18, il met en évidence huit ribotypes à partir de deux enzymes de restriction (quatre avec l'enzyme *Eco* RI et quatre autres avec *Pvu* II). Dans le même temps il réalise le profil estérasique et détermine ainsi 6 zymotypes.

Electrophorèse des estérases et ribotypage sont donc capables de différencier entre elles des souches d'*A. baumannii* qui ont le même biotype. On peut retenir

de cette étude que l'électrophorèse des estérases et le ribotypage sont des méthodes plus discriminantes et plus précises que le biotypage.

III-2-3) Electrophorèse en champ pulsé

L'ADN bactérien total est inclus dans des blocs d'agarose. Des enzymes de restriction l'hydrolysent en fragments de grande taille. Un appareillage spécifique, composé d'électrodes qui produisent des champs électriques alternés et programmables, permet de séparer ces fragments par électrophorèse. Les fragments sont ensuite visualisés grâce au bromure d'éthidium. L'ensemble de ces fragments appelé aussi pulsotype est caractéristique d'une souche [46].

Cette technique a été appliquée pour de nombreuses espèces bactériennes et dès 1992, pour *Acinetobacter baumannii* [25].

C'est un marqueur épidémiologique qui est stable, reproductible et qui donne un grand polymorphisme.

III-2-4) Typage par amplification génique : PCR

Le typage par amplification génique utilise des primers ou amorces qui s'hybrident à une portion d'ADN et encadrent une séquence du génome qui sera amplifiée.

Différentes amorces ont été utilisées pour le typage des souches d'*A. baumannii* par exemple la séquence du core du phage M13 [26]. Ces amorces correspondent à des régions répétées et conservées du génome, elles sont présentes chez diverses espèces bactériennes [47];[55].

Les régions amplifiées du génome ont une taille variable selon les souches. Après migration électrophorétique des amplicons, on obtiendra un profil permettant la comparaison des souches entre elles.

III-2-5) Intérêt des méthodes génotypiques

Ces méthodes deviennent accessibles à de nombreux laboratoires qui possèdent la technologie de l'étude de l'ADN. Elles sont en plein développement pour le typage des souches, leur pouvoir discriminant et leur utilisation en épidémiologie restent encore à approfondir.

IV HABITAT

IV-1) Habitat des différentes espèces

Les bactéries du Genre *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquitaires, elles se rencontrent dans l'environnement (sol, eau douce et marine) et dans les produits alimentaires (lait, viande, volailles). Elles peuvent appartenir à la flore transitoire de l'homme notamment la flore cutanée (creux axillaire, espaces interdigitaux et région inguinale), digestive et oropharyngée.

Selon certains auteurs *A. calcoaceticus* resterait exclusivement une espèce tellurique.

D'autres espèces telles que : *A. haemolyticus*, *A. junii* et *A. johnsonii* se rencontrent dans l'environnement notamment dans les boues activées de station d'épuration mais aussi en milieu hospitalier, en particulier *A. johnsonii* et *A. lwoffii* fréquemment isolés sur les mains du personnel soignant et du personnel de laboratoire [9].

A. radioresistens [13] est une espèce décrite en 1988 ; elle présente une résistance élevée aux radiations. On la retrouve sur le matériel médical stérilisé par irradiation et dans l'industrie alimentaire : viandes et volailles.

Dans toutes les études épidémiologiques, *A. baumannii* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée. Elle est isolée chez l'homme où elle représente 90 à 95% des infections à *Acinetobacter*. Dans l'environnement hospitalier, sa présence résulte d'une contamination par l'homme colonisé.

IV-2) *Acinetobacter baumannii* chez l'homme et dans l'environnement hospitalier

Acinetobacter baumannii peut faire partie de la flore cutanée et oropharyngée de l'homme sain (25% des individus en hébergent). On l'isole souvent sur les lésions de patients présentant des maladies de peau telles que l'eczéma.

Chez les malades des services de soins intensifs, le tube digestif constitue un important site de colonisation [58];[68].

Le réservoir primaire est constitué par les malades infectés ou colonisés. L'environnement hospitalier joue le rôle de réservoir secondaire où les lieux d'isolement d'*A. baumannii* sont multiples :

- sur le matériel d'assistance respiratoire : respirateurs, humidificateurs d'air [55] ou sur le matériel de réanimation [56] ;

- dans les chambres des malades : matelas, thermomètre, laryngoscope [23], fenêtres, table de chevet, ventilateurs, magnétophone, télévision [29] et sur des objets humides : lavabos, savons, antiseptiques, serviettes et gants de toilette ;

- dans l'air et sur le sol des services. On a remarqué que cette bactérie résistait plus longtemps que d'autres espèces sur les surfaces inertes. 13% des prélèvements effectués sur les sols hospitaliers contiennent *A.baumannii* [34].

- sur le personnel soignant : des prélèvements effectués sur les habits, les doigts et les gants se sont avérés positifs ; cela constitue un facteur très important de risque de transmission.

IV-3) Facteurs de risque et modes de transmission

Acinetobacter baumannii est une bactérie opportuniste responsable d'infections chez les malades dont les défenses immunitaires sont diminuées. Son développement est influencé par l'hospitalisation prolongée en service de réanimation ou de soins intensifs, ce qui augmente les chances de colonisation, et par un traitement antibiotique large spectre [65].

Cette espèce est souvent retrouvée dans les services de réanimation et de soins intensifs où les malades sont sous assistance respiratoire, en chirurgie notamment en neurochirurgie mais également dans les services de brûlés, d'hémodialysés [12], en pneumologie et hématologie [24].

Les modes de transmission sont multiples :

- par le matériel respiratoire et par l'air ambiant
- par le personnel soignant

-lors de transfert de malades d'un service à un autre :
transmission interservices.

De nombreuses mesures de prévention sont prises pour lutter contre les risques de transmission [6] :

-éducation du personnel soignant : port de gants, de masque, lavage des mains avant et après chaque patient, utilisation de matériel à usage unique.

-isolement et surveillance bactériologique des personnes infectées ou colonisées, diminution du portage cutané par désinfection à la chlorhexidine, traitement des plaies à la polymyxine B [23], décontamination sélective du tube digestif.

-contrôle de l'environnement : désinfection des chambres, stérilisation du matériel respiratoire.

-collaboration étroite entre les services cliniques et le laboratoire de Bactériologie, réalisation d'enquêtes épidémiologiques.

V POUVOIR PATHOGENE

V-1) Incidence d'*Acinetobacter baumannii*

dans les infections nosocomiales

Depuis une dizaine d'années, une nette augmentation des infections nosocomiales à *A. baumannii* a été observée dans de nombreux rapports. Joly Guillou [34] rapporte les résultats d'une enquête épidémiologique réalisée en 1991 dans les unités de soins intensifs des centres hospitaliers français, où il apparaît que les infections à *Acinetobacter* représentent 9% des infections nosocomiales. Cela est sans doute lié à l'utilisation de nouvelles techniques médicales qui améliorent le pourcentage de survie des malades mais en même temps augmente les agressions cutané-muqueuses et favorisent la colonisation par des bactéries potentiellement responsables d'infections nosocomiales [36].

Les infections à *A. baumannii* évoluent par bouffées épidémiques sur un fond d'endémie.

Le rôle pathogène direct est souvent difficile à prouver en raison de la gravité de la pathologie associée [24], cependant on pense que ces bactéries ont un faible pouvoir de virulence.

V-2) Les sites de prélèvements

Alors que pendant de nombreuses années les surinfections des plaies opératoires et les infections urinaires prédominaient, les résultats [35] de l'enquête réalisée dans les unités de soins intensifs français, révèlent que l'un des premiers sites d'infections est bronchopulmonaire. Parallèlement, dans une autre étude [32], on a constaté que la proportion de souches isolées dans les urines n'a cessé de décroître entre 1984 et 1988 passant de 34,5% à 16,5%.

Acinetobacter est mis en évidence dans :

- les prélèvements de sécrétion bronchiques
non protégés : aspirations, expectorations
protégés réalisés sous fibroscopie : brosse, liquide
de lavage bronchoalvéolaire.
- les urines
- les hémocultures
- les pus profonds et superficiels
- les cathéters
- les liquides biologiques divers : liquide pleural, péritonéal et
liquide céphalorachidien.

V-3) Les infections

Les infections surviennent fréquemment après une colonisation. Elles sont diverses, les principales sont :

V-3-1) Les infections respiratoires

Les pneumopathies (pneumonies, bronchopneumonies) et les pleurésies se produisent à la suite de la mise en place d'une ventilation assistée. En France les pneumopathies à *Acinetobacter* représentent 15% des pneumopathies nosocomiales [36].

Une étude menée sur dix ans, entre 1981 et 1991 [2], dans le nord de l'Australie, a décrit une mortalité élevée des patients atteints de pneumonies à *Acinetobacter*. La mortalité est influencée par la gravité de la pathologie sous-jacente mais aussi par des facteurs de risque tels que l'alcoolisme, le tabagisme et le diabète.

V-3-2) Les infections urinaires

Elles sont liées à une cause mécanique à la suite de la mise en place d'une sonde vésicale, urétérale ou de néphrostomie [43]. L'adénome prostatique impose des manoeuvres instrumentales qui peuvent être cause d'infections.

V-3-3) Les septicémies et bactériémies

Elles sont secondaires et surviennent le plus souvent :

après mise en place d'une ventilation assistée lorsqu'il existe une colonisation ou une infection des voies respiratoires [57] ;

à la suite d'une intervention chirurgicale digestive ;

après mise en place ou lors du retrait d'un cathéter veineux (risque de thrombose septique autour du cathéter) ;

après antibiothérapie à large spectre.

Récemment ont été décrites, en service de gynécologie obstétrique, des épidémies de bactériémies et de septicémies à *Acinetobacter* chez des patientes recevant des perfusions de tocolytiques [50]. La contamination du liquide de perfusion serait à l'origine. La bactérie colonisant la peau, pourrait gagner le liquide par un phénomène rétrograde. Contrairement aux autres bactéries isolées sur la peau, *Acinetobacter* serait capable de détruire un des stabilisateurs composant la perfusion et pourrait alors se multiplier.

V-3-4) Les méningites

Elles sont rares et, en général, secondaires à une ponction lombaire, à la mise en place d'une valve de dérivation ou à la suite d'un traumatisme tel qu'une fracture du crâne [52].

V-3-5) Les suppurations diverses

Dans les services de grands brûlés et en chirurgie osseuse, des surinfections de plaies ou de matériels étrangers tels que prothèses ou broches ont été observées.

V-3-6) Autres infections

L'apparition de sinusites après intubation par voie nasale est fréquente.

Acinetobacter baumannii est également responsable de péricardites, endocardites, péritonites sur dialyse péritonéale et conjonctivites.

Enquêtes sur la résistance d'*Acinetobacter baumannii*
dans différents hôpitaux de 1987 à 1993

<u>ANTIBIOTIQUES</u>	1987 Bichat [43]	1988 Bichat [32]	1990 Tunis [1]	1991 France[36] Soins Intensifs	1993 Espagne [66]
<i>Ticarcilline</i>	75%	78,5%	63%	50%	70%
<i>Cefotaxime</i>	95%	96%	88%	74%	69%
<i>Ceftazidime</i>	64%	92%	80%		45%
<i>Imipénème</i>	2,3%	5,5%	0%	0,6%	0%
<i>Gentamicine</i>	91%	86%	73%	70%	67%
<i>Tobramycine</i>	47%	84%	33%	62%	50%
<i>Amikacine</i>	42%	84%	39%	55%	28%
<i>Netilmicine</i>		78%	32%	45%	34%
<i>Fluoroquinolones</i>	<i>Péfloxacine</i> 63%	<i>Péfloxacine</i> 92,5%	<i>Ofloxacine</i> 44%		<i>Ofloxacine</i> 28%

Tableau n°2

Dans ce tableau, il apparaît que les pourcentages de résistance n'augmentent pas au cours du temps. Cela peut s'expliquer par la variation, d'une étude à une autre, des critères de réalisation. Par exemple la présence d'une épidémie au moment de l'étude ou bien la tolérance de redondances, influencent les résultats.

VI SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

VI-1) *Acinetobacter baumannii* : une bactérie multirésistante

Il est maintenant reconnu que l'utilisation croissante d'antibiotiques à large spectre au cours de ces dernières années est en partie responsable de la sélection de souches résistantes. L'évolution de la résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux différentes familles d'antibiotiques a été progressive.

Au départ cette espèce était sensible à la majorité des molécules actives sur les bacilles Gram négatif, puis quasiment toutes les souches sont devenues résistantes aux aminopénicillines, aux céphalosporines de 1ère et 2ème génération ainsi qu'aux quinolones de 1ère génération. Maintenant on observe aussi une résistance aux carboxy et uréidopénicillines, aux céphalosporines de 3ème génération, aux aminosides et aux fluoroquinolones. L'imipénème reste la molécule la plus active, les souches résistantes sont encore rares. Différents mécanismes de résistance acquis par *A. baumannii* sont à l'origine de cette multirésistance.

Plusieurs enquêtes, réalisées dans différents hôpitaux, font état des résistances aux différents antibiotiques (tableau n°2).

VI-2) Résistance aux β -lactamines

VI-2-1) Mécanismes de résistance

La majorité des mécanismes de résistance des bactéries aux β -lactamines est enzymatique (par l'acquisition de gènes codant pour la production d'enzymes). Ces enzymes agissent par hydrolyse : ce sont les β -lactamases.

D'autres mécanismes ont été décrits : l'imperméabilité membranaire et l'altération des Protéines Liant les Pénicillines (P.L.P.).

Acinetobacter réunit souvent plusieurs de ces mécanismes de résistance.

a) Résistance aux pénicillines

Les enzymes responsables sont des β -lactamases type pénicillinase qui inactivent l'ampicilline, les carboxypénicillines (ticarcilline) et uréidopénicillines (pipéracilline). Ces pénicillinases sont inhibées partiellement par l'acide clavulanique. Actuellement 3 types de pénicillinases transférables d'origine plasmidique sont impliquées dans la résistance d'*A. baumannii* aux β -lactamines. Ce sont :

-TEM 1 : pénicillinase prédominante dont le pI (point isoélectrique) est 5,4

-TEM 2 : pI 5,6

-CARB 5 : pénicillinase la plus récente, pI à 6,3, inactive l'ampicilline et la ticarcilline. Toutefois certains auteurs [37] ont signalé la présence d'une activité céphalosporinase de CARB 5 pour un petit nombre de souches.

b) Résistance aux céphalosporines

Elle est due à la présence de céphalosporinases d'origine chromosomique inductibles ou constitutives de classe I et de pI supérieur à 8. Elles inactivent toutes les céphalosporines y compris les céphalosporines de 3ème génération. Hood et Amyes [28] ont montré l'existence de 4 types de céphalosporinases (pI compris de 7,3 à 8,8) : appelées ACE (*Acinetobacter Chromosomal Enzyme*). ACE 1 et 2 sont retrouvées chez *A. baumannii*, ACE 3 chez *A. junii* et ACE 4 chez *A. Iwoffii*.

c) β -lactamase à spectre étendu

En 1989, à l'hôpital Bichat [30], a été isolée d'un prélèvement urinaire, une souche d'*A. baumannii* présentant à l'antibiogramme une résistance à toutes les β -lactamines excepté à l'imipénème avec présence d'une synergie entre le disque d'amoxicilline-acide clavulanique et celui des céphalosporines de 3ème génération.

Il s'agit d'une β -lactamase (pI=7,7) type pénicillinase différente de TEM et CARB, mais qui reste inhibée par l'acide clavulanique. Elle n'est pas de type céphalosporinase, bien qu'elle hydrolyse les céphalosporines de 3ème génération.

A l'antibiogramme, il en résulte une image de synergie dite en "bouchon de champagne" qui l'apparente ainsi aux β -lactamases à spectre étendu des entérobactéries.

d) Résistance à l'imipénème

L'imipénème reste l'antibiotique le plus actif sur *Acinetobacter baumannii*, il présente une grande stabilité vis à vis des β -lactamases [64]. Quelques souches de sensibilité diminuée voire résistantes ont été isolées mais leur proportion est faible (tableau n° 2 p 27).

Cette résistance est indépendante des mécanismes décrits plus haut auxquels elle peut être associée.

De nombreuses études sont conduites pour tenter d'expliquer la résistance à l'imipénème. A l'heure actuelle on s'oriente vers trois voies de recherche :

→Altération des Protéines Liant les Pénicillines (PLP) :

Une étude a comparé une souche imipénème sensible avec son homologue imipénème résistant obtenu par mutation [18]. Les auteurs ont démontré qu'il existe une complexe réorganisation des PLP avec diminution de toutes les PLP excepté la 24 kD PLP ayant une affinité très diminuée pour l'imipénème.

Trois mécanismes peuvent expliquer cette altération :

- La 24kD pourrait être la PLP précurseur de toutes les autres. Si une mutation modifie la traduction du précurseur, il y aura diminution de la synthèse des autres PLP et une augmentation, en amont, de la 24 kD.

- La 24kD serait le produit de dégradation des autres PLP.

- Plus probablement, une mutation sur le gène de contrôle entraînerait une augmentation de l'expression du gène structural de la 24kD aux dépens des autres PLP.

Récemment des auteurs ont décrit la modification de l'expression des PLP à 80 et 90 kD [16] qui pourrait aussi expliquer la diminution d'affinité d'*Acinetobacter* pour l'imipénème.

→Inactivation enzymatique :

En 1985, en Grande Bretagne, une souche d'*A. baumannii* a été isolée d'une hémoculture [45]. Cette souche était résistante à l'imipénème ainsi qu'aux pénicillines et aux céphalosporines. L'isoélectrofocalisation a révélé la présence d'une céphalosporinase et d'une nouvelle β -lactamase (pI=6,65). Cette dernière est appelée ARI 1 : (*Acinetobacter* résistant à l'imipénème) ou carbapénémase, elle est d'origine chromosomique. Elle hydrolyse la pénicilline, l'ampicilline, les céphalosporines de 1ère génération et l'imipénème ; elle n'est pas inhibée par l'acide clavulanique.

→Modification de la perméabilité membranaire :

La présence d'un plasmide entraînerait la modification de la structure du lipopolysaccharide de la membrane externe et donc une diminution de la perméabilité membranaire.

Les porines, protéines constituant cette membrane et permettant le passage des molécules à l'intérieur de la bactérie, seraient moins produites [44]. La diminution de la perméabilité par modification des porines est un mécanisme de résistance déjà connu pour *Pseudomonas aeruginosa*. Une hypothèse récente [16] avance qu'il y aurait diminution de l'expression de certaines protéines membranaires telles que : Omp 46kD.

Ces trois mécanismes peuvent être réunis dans une même souche pour expliquer sa résistance à l'imipénème.

VI-2-2) Rôle des inhibiteurs de β -lactamases

Les inhibiteurs de β -lactamases sont des molécules suicides inhibant irréversiblement les β -lactamases.

L'originalité de ces molécules, en particulier le sulbactam et le tazobactam, est d'avoir en plus une activité intrinsèque vis à vis du Genre *Acinetobacter*.

a) Activité intrinsèque

Les inhibiteurs de β -lactamases ont une structure de β -lactamine. Certains auteurs [40] ont suggéré que ces molécules pourraient avoir un effet antibactérien en se fixant sur les P.L.P.

Il existe trois inhibiteurs de β -lactamases.

L'acide clavulanique est le premier découvert qui possède une faible activité intrinsèque.

Le sulbactam a, par contre, une bonne activité intrinsèque notamment sur les souches d'*A. baumannii* non productrices de pénicillinases et la présence de céphalosporinases ne modifie pas les résultats. Sur les souches productrices de pénicillinases, il n'a pas d'effet propre (tableau n°3).

Le tazobactam présente une activité proche du sulbactam.

	C.M.I. (mg/l) des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> :			
	<u>non productrices</u>	<u>P.ase</u>	<u>C.ase</u>	<u>P.ase et C.ase</u>
Ticarcilline	25	>512	38	>512
Sulbactam	1,4	16	2,3	18,3
Tazobactam	2,3	8	8,9	6,8

Tableau n°3

P.ase : pénicillinase, C.ase : céphalosporinase

[Résultats communiqués par Mme Joly Guillou déc. 94]

b) Activité inhibitrice de β -lactamase

L'acide clavulanique inhibe spécifiquement les pénicillinases.

Les C.M.I. de la ticarcilline associée à l'acide clavulanique sont très diminuées par rapport à celles de la ticarcilline seule passant de >512 à 45,2 pour les souches productrices de pénicillinases (tableau n°4 p.33). Toutefois il n'y a pas de retour véritable à la sensibilité car la réversion dépend de la quantité d'enzyme produite [63].

Sur les souches présentant une céphalosporinase hyperproduite, on observe une légère diminution de la C.M.I. ticarcilline-acide clavulanique qui est liée à l'activité intrinsèque de l'acide clavulanique.

Le sulbactam inhibe, sur extrait enzymatique les pénicillinases et les céphalosporinases.

Associé à la ticarcilline, il n'a pas d'action sur les souches productrices de pénicillinase ; par contre l'association est efficace, sur les souches présentant une céphalosporinase hyperproduite.

Dans l'association aux céphalosporines de 3ème génération, sur les souches produisant une pénicillinase, l'activité revient aux céphalosporines uniquement : les C.M.I. ne varient pas. Sur les souches productrices de céphalosporinases ou de céphalosporinases et pénicillinases, l'association permet une diminution des C.M.I. (tableau n°4 p.33).

Cependant comme l'a constaté Vallée dans son étude [63], la quantité de sulbactam mise en présence des β -lactamases au niveau cellulaire doit être suffisante pour être efficace.

Le tazobactam possède une activité similaire au sulbactam. Son association avec la pipéracilline serait efficace sur les souches productrices d'un certain type de céphalosporinase et qui sont intermédiaires à la ceftazidime [53].

C.M.I. (mg/l) des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> :			
	productrices de : P.ase	C.ase	P.ase et C.ase
TIC	>512	38	>512
TIC et ac. clav.	45,2	23	102
CTX	4,6	41,8	55
CTX et sulbactam	6,3	2,2	11,9
CTX et tazobactam	6,3	7,2	5,5
CAZ	4	8	12,5
CAZ et sulbactam	2,5	1,7	6,8
CAZ et tazobctam	4	5,2	6,5

Tableau n°4

TIC : ticarcilline, CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime
 [Résultats communiqués par Mme Joly Guillou]

c) Association d'inhibiteurs de β -lactamases :

Acide clavulanique et sulbactam

Cette association s'est révélée synergique *in vitro*. Le sulbactam agit à la fois comme une β -lactamine et comme un inhibiteur de β -lactamases ; on a observé une réduction de la C.M.I. du sulbactam vis à vis des souches productrices de pénicillinases les ramenant au niveau des souches sensibles [39].

Distribution des phénotypes de résistance d'*Acinetobacter baumannii*

aux β -lactamines

Antibiotiques	Phénotype sensible	Phénotypes résistants						
		II P.ase +	III Sous type a C.ase +/-	Sous type b C.ase +	Sous type a P.ase + C.ase +/-	IV Sous type b P.ase + C.ase +	Sous type c P.ase - C.ase -	V
Ticarcline	S	R	S ou I	I ou R	R	R	R	V
Ticarcline et ac. clav.	S	I	S ou I	I ou R	R	R	R	V
Piperacilline	S	R	I ou R	I ou R	R	R	R	V
Cefotaxime	S	S	R	R	R	R	R	V
Ceftazidime	S	S	S ou I	R	I ou R	R	R	V
Imipénème	S	S	S	S	S	S	S	R
% de fréquence	22	4	35	38				1

P.ase : pénicillinase, C.ase : céphalosporinase

S : souche sensible, R : souche résistante, I : souche intermédiaire, V : sensibilité variable.

Tableau n° 5

[37] ; [communications Joly Guillou déc. 94]

VI-2-3) Phénotypes de résistance aux β -lactamines

Pour faciliter l'interprétation de l'antibiogramme, des phénotypes de résistance ont été corrélés aux profils enzymatiques. Joly Guillou et coll. ont décrit cinq phénotypes majeurs en fonction de leur résistance aux principales β -lactamines (imipénème, carboxypénicillines : ticarcilline, uréidopénicillines : piperacilline et céphalosporines de 3ème génération : céfotaxime, ceftazidime). Aujourd'hui quasiment toutes les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes aux aminopénicillines ainsi qu'aux céphalosporines de 1ère et 2ème génération. Cependant il existe le phénotype sauvage résistant uniquement à la pénicilline G. Exceptionnellement rencontré, il ne fait pas parti des cinq phénotypes majeurs.

a) Phénotype I sensible

Il regroupe les souches sensibles aux carboxy et uréidopénicillines et aux céphalosporines de 3ème génération.

Les diamètres moyens d'inhibition sont les suivants :

ticarcilline : 28 mm, ticarcilline et acide clavulanique : 27

pipéracilline : 22, pipéracilline et tazobactam : 22

céfotaxime : 23, ceftazidime : 25, imipénème : 32

Les souches appartenant à ce phénotype expriment à bas niveau une β -lactamase de type céphalosporinase susceptible d'inactiver les aminopénicillines (amoxicilline, amoxicilline et acide clavulanique) et les céphalosporines de 1ère et 2ème génération (céfalotine, cefoxitine et céfoperazone). La présence de cette céphalosporinase est controversée, en effet certains auteurs [37];[63] n'ont pas détecté d'activité β -lactamase.

Il faut noter que ce phénotype est sensible au sulbactam et présente une sensibilité diminuée à l'aztréonam et au latamoxef, les diamètres respectifs sont 20 et 18 mm.

b) Phénotype II

Ces souches produisent une pénicillinase type TEM 1, TEM 2 ou CARB 5. Elles sont résistantes à la ticarcilline et à la pipéracilline (diamètre contact ou < 15 mm). L'association ticarcilline et acide clavulanique est synergique. Les céphalosporines de 3ème génération et l'imipénème ne sont pas touchés. La sensibilité au sulbactam et au tazobactam est diminuée.

c) Phénotype III

Il caractérise les souches résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (diamètres cefotaxime et ceftazidime < 20 mm) avec une sensibilité diminuée à la pipéracilline (diamètre < 20 mm). Le niveau de résistance à la ticarcilline est variable (diamètre > 15 mm et < 27 mm) et). Ces souches sont sensibles à l'imipénème.

Cependant c'est un groupe hétérogène dans lequel on distingue deux sous types selon le niveau de résistance aux céphalosporines qui dépend du degré d'expression des céphalosporinases [37].

- Sous type a : les souches présentent un bas niveau de résistance. Seule la céfotaxime est résistante.

- Sous type b : rassemble les souches qui ont un haut niveau de résistance à toutes les céphalosporines. C'est le sous type majoritaire. Ce phénotype reste sensible au sulbactam et au tazobactam.

d) Phénotype IV

Ce phénotype rassemble les souches résistantes à toutes les β -lactamines (diamètres ticarcilline < 15 mm et cefotaxime et ceftazidime < 20 mm) excepté à l'imipénème.

Ce n'est pas un groupe homogène. Il se divise en trois sous types :

- Sous type a : exprime seulement une pénicillinase type TEM ou CARB. Aucune activité de céphalosporinase n'a été mise en évidence.

- Sous type b : possède les deux types d'enzymes : pénicillinase et céphalosporinase.

- Sous type c : n'a pas d'activité β -lactamase évidente. Joly Guillou et coll. supposent qu'il pourrait s'agir d'une résistance par altération de la

perméabilité de la membrane externe suite à une modification de la structure du lipopolysaccharide.

e) Phénotype V

Il regroupe toutes les souches résistantes aux carbapénèmes (imipénème, biapénème, méropénème). Il peut s'associer aux autres phénotypes.

L'ensemble de ces phénotypes sont regroupés dans le tableau n°5 p.34. La majorité des souches d'*Acinetobacter baumannii* appartiennent aux phénotypes III et IV et cela semble s'accroître au cours du temps.

VI-3) Résistance aux aminosides

VI-3-1) Mécanismes de résistance

La plupart des mécanismes de résistance aux aminosides sont enzymatiques [31]. Ces enzymes sont situées de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, codées par des gènes chromosomiques mais plus souvent par des gènes plasmidiques transposables, elles sont constitutives.

Il existe trois classes d'enzymes selon le mode d'inactivation de l'antibiotique :

-phosphorylation, c'est l'*Aminoside -O- phosphotransférase* : APH

-nucléotidylation ou adénylylation : *Aminoside -O- Nucléotidyltransférase* : ANT

-acétylation : *Aminoside -N- Acétyltransférase* : AAC.

Chaque classe d'enzymes est subdivisée en sous classes en fonction du site modifié sur la molécule d'antibiotique. En général les enzymes sont relativement spécifiques de la bactérie qui les synthétise et chacune agit sur un certain nombre d'aminosides.

Les principales enzymes rencontrées chez *A.baumannii* sont :

-3-N-Acétyltransférase I : AAC 3 I : résistance à la gentamicine ;

-3-N-Acétyltransférase II et V : AAC(3) II et V : résistance à la kanamycine, la tobramycine, la gentamicine et à la nétilmicine

Aminosides : expression phénotypique et fréquence en France
des enzymes d'inactivation chez *Acinetobacter baumannii*

Phénotype	K	Nm	G	T	Nt	Ak	Enzymes	Fréquence (%)
KNm	R	R	S	S	S	S	APH 3' I	40
KNmAk	R	R	S	S	S	R	APH 3' VI	48
KGT	R	S	R	R	S	S	ANT 2''	27
G	S	S	R	S	S	S	AAC 3 I	38
GNt	S	S	R	S	R	S	AAC 3 Ia	67
KGTNt	R	S	R	R	R	S	AAC 3 V	11
KTNtAk	R	S	S	R	R	R	AAC 6' I	35
KGTNt	R	S	R	R	R	S	AAC 6'' II	5

K : kanamycine, Nm : néomycine, G : gentamicine, T : tobramycine, Nt : nétilimicine, Ak : amikacine

Tableau n° 6

-6'-N-Acetyltransférase I : AAC 6' I : résistance à la tobramycine, l'amikacine et à la nétilmicine ;

-3'-Phosphotransférase I et II : APH 3' I et II : résistance à la kanamycine ;

-2''-N-Nucléotidyltransférase : ANT 2'' : résistance à la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine ;

-une nouvelle enzyme, la 3'-O-Phosphotransférase VI (APH 3' VI) a été mise en évidence ; elle hydrolyse l'amikacine et la kanamycine [42].

Cependant Vila et coll. [66] ont observé qu'une partie des souches qu'ils avaient testées et qui étaient résistantes à la nétilmicine, à la tobramycine et à la gentamicine n'avaient pas d'activité enzymatique détectable, possédant peut être d'autres mécanismes de résistance tels que la diminution de la perméabilité ou l'altération des sites de liaison.

VI-3-2) Phénotypes de résistance aux aminosides

Un phénotype de résistance est défini par une enzyme. Les principaux phénotypes, leur description et leur fréquence sont décrits dans le tableau n°6.

VI-4) Résistance aux quinolones

L'augmentation de la résistance aux fluoroquinolones a été observée dès l'introduction sur le marché de ces molécules entre 1985 et 1990 [34]. Sur trois fluoroquinolones testées en 1992, la norfloxacin était la moins active (18% seulement de souches sensibles) contre 70% pour la ciprofloxacine et 72% pour l'ofloxacine [66].

VI-5) Autres antibiotiques utilisés

Plusieurs études effectuées, *in vitro*, montrent une bonne activité du cotrimoxazole et de la polymixine B sur l'espèce *Acinetobacter baumannii* [23] [61] [62] [69]. La colistine (polymixine B) est efficace sur les souches résistantes aux aminosides, à toutes les β -lactamines y compris à l'imipénème.

Seule l'utilisation *in vivo* sous forme d'aérosol peut être considérée comme une alternative thérapeutique.

VI-6) Association d'antibiotiques

Devant la multirésistance d'*Acinetobacter*, les associations d'antibiotiques ayant des mécanismes d'action différents ont été envisagées. Par exemple des molécules telles que le sulbactam, la nétilmicine ou l'amikacine peuvent être associées aux β -lactamines.

Plusieurs études [27];[36] ont testé l'association β -lactamines et aminosides, *in vitro*, sur des souches résistantes aux céphalosporines de 3ème génération et à l'amikacine ; ainsi a t-on pu observer une amélioration des activités bactéricides de l'imipénème et de la ticarcilline lorsqu'on leur associe la nétilmicine.

Pour certains auteurs [70], les associations imipénème-amikacine ou ceftazidime-amikacine peuvent être utilisées en première intention avant le résultat de l'antibiogramme. Dans les autres cas des tests préalables *in vitro* sont nécessaires.

L'utilisation des fluoroquinolones en association peut être décidée après étude *in vitro* de la bactéricidie.

SENSIBILITE
AUX ANTIBIOTIQUES
D'ACINETOBACTER BAUMANNII
AU BLOC DE REANIMATION
RESPIRATOIRE
EN 1993

I PRESENTATION DE L'ETUDE

I-1) *Acinetobacter baumannii* et les autres bactéries responsables d'infections nosocomiales au bloc de réanimation respiratoire (B.R.R.)

Les principales bactéries responsables d'infections nosocomiales au B.R.R. sont : *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* multirésistant (résistant à la pénicilline et aux aminosides) encore appelé SAMR et *Pseudomonas aeruginosa*. Le tableau n°7 fait apparaître l'importance de ces trois espèces dans ce service au cours de l'année 1993.

Nombre de malades hospitalisés au B.R.R. :	1165
Nombre de malades sous ventilation artificielle :	336
Nombre de malades colonisés ou infectés par :	
<i>Acinetobacter baumannii</i> :	77
<i>Staphylococcus aureus</i> multi R :	66
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	65

Tableau n°7

Les souches appartenant à ces trois espèces bactériennes ont été isolées dans différents sites d'infection ou de colonisation. Nous avons établi des histogrammes dans lesquels les prélèvements ont été classés en quatre catégories selon leur origine :

Sécrétions trachéo-bronchiques regroupant aspirations, expectorations bronchiques, brosses et lavages bronchoalvéolaires.

Hémocultures

Urines

Prélèvements d'origines diverses réunissant suppurations (pus, plaies, abcès), prélèvements vaginaux et urétraux, liquides pleuraux, drains et cathéters.

Lorsque la bactérie a été isolée plusieurs fois dans ces différentes catégories chez un même malade, nous n'avons retenu qu'une seule souche par catégorie afin d'éviter les redondances.

Le premier histogramme (fig. 1) nous permet de mettre en évidence le nombre de prélèvements dans chaque catégorie pour ces trois espèces bactériennes. Celles-ci se retrouvent dans les mêmes sites.

La catégorie majoritaire est celle des sécrétions trachéo-bronchiques. Cela correspond au fait que les patients admis au B.R.R. sont souvent sous ventilation artificielle et le contrôle bactériologique des sécrétions par aspiration trachéale est un examen systématiquement effectué deux fois par semaine chez les patients qui séjournent plus de 48 heures dans le service.

Dans les histogrammes suivants (fig. 2, 3, 4), les catégories de prélèvements réparties mois par mois ont été représentées pour chacune des trois espèces. Nous avons pu constater qu'il n'existait pas de période de l'année clairement prédominante.

***Acinetobacter baumannii*, S.A.M.R. et *Pseudomonas aeruginosa* se répartissent de manière identique dans les différentes catégories quelque soit la période de l'année considérée. Toutefois *A. baumannii* est plus fréquemment isolé des sécrétions trachéo-bronchiques et des prélèvements d'origines diverses (fig.1).**



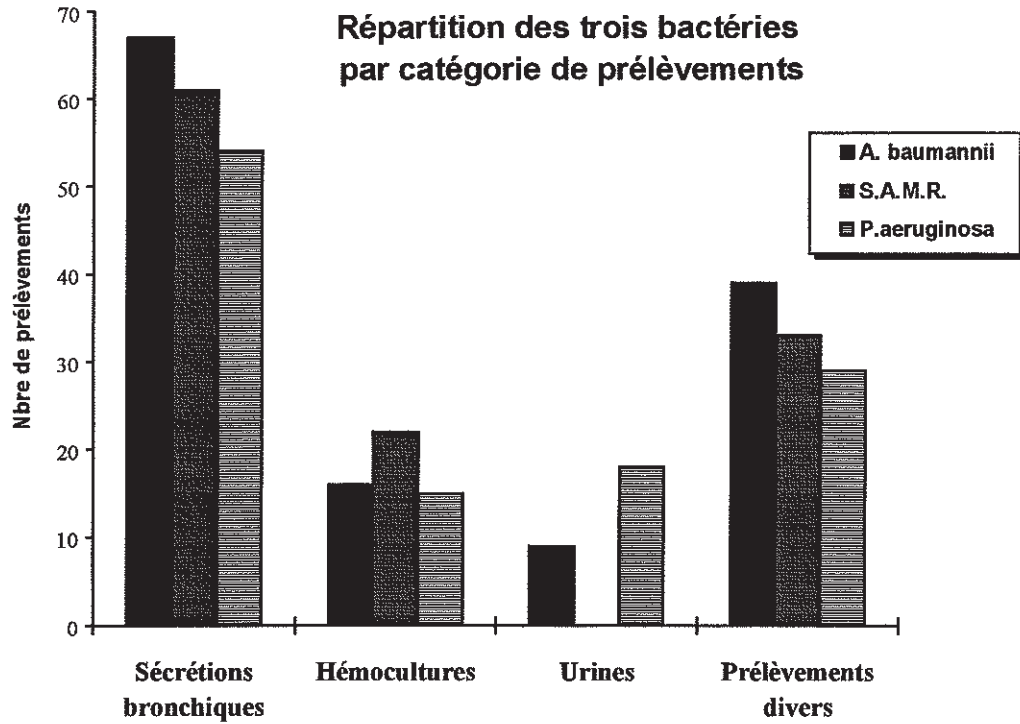


Figure n° 1

Répartition mois par mois des prélèvements d'*Acinetobacter baumannii*

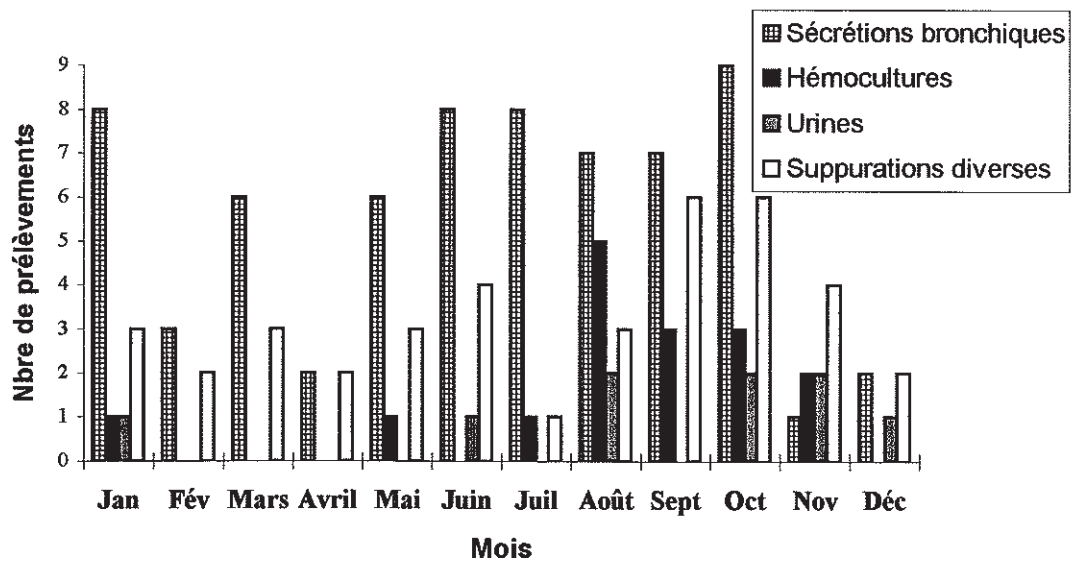


Figure n°2

Répartition mois par mois des prélèvements de *Pseudomonas aeruginosa*

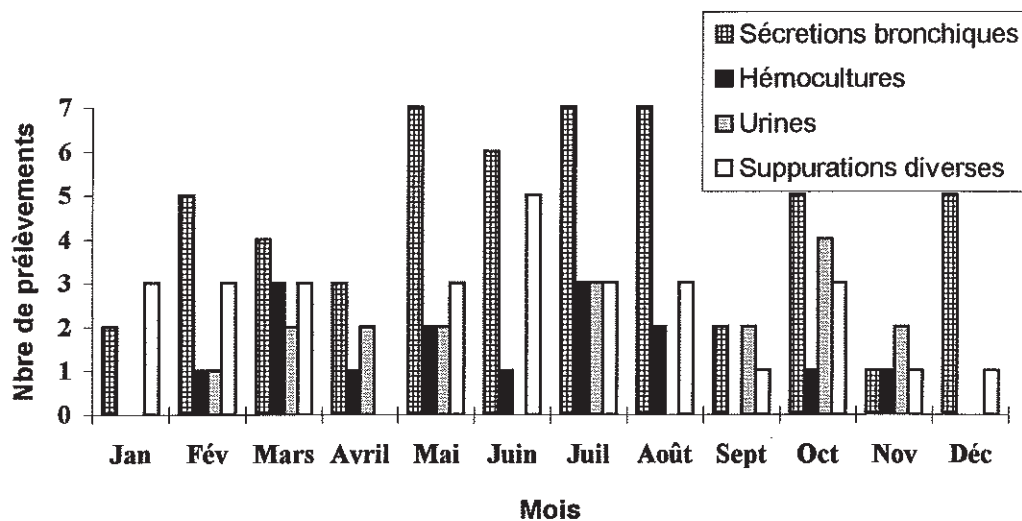


Figure n°3

Répartition mois par mois des prélèvements de *Staphylococcus aureus* multirésistant

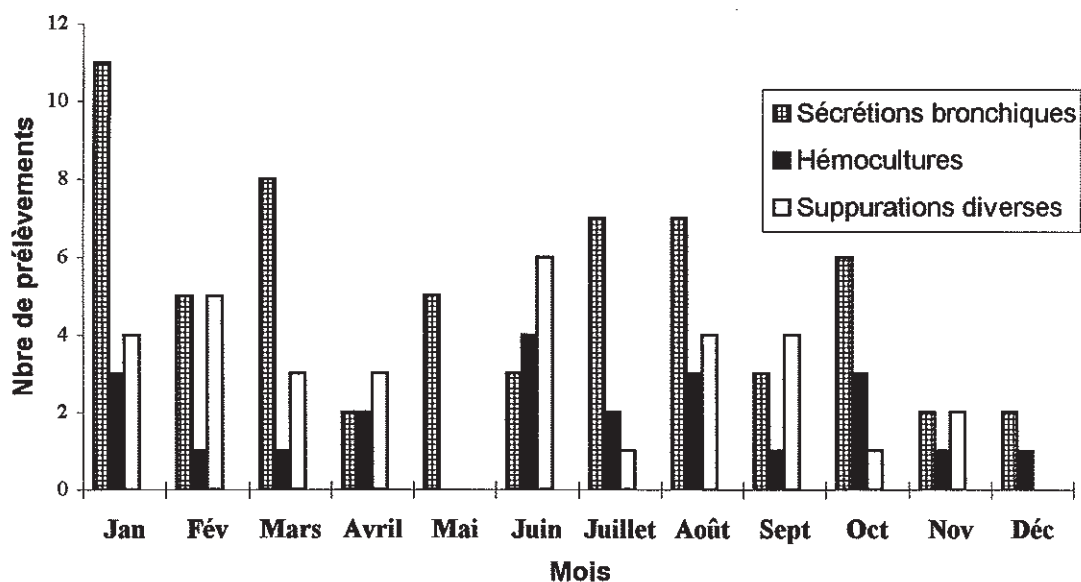


Figure n° 4

I-2) But de l'étude

I-2-1) Les motivations

Le suivi régulier des antibiogrammes d'*Acinetobacter baumannii* nous a alerté sur l'apparition, à partir du mois de Mai, de souches présentant un diamètre diminué à l'imipénème proche des zones intermédiaire et résistante. Cet antibiotique est largement utilisé car souvent seul actif sur cette bactérie multirésistante.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier plus précisément la sensibilité de cette espèce bactérienne à l'imipénème et aux autres antibiotiques.

I-2-2) Les objectifs

Nous avons voulu préciser l'effet bactériostatique des antibiotiques par l'étude des concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) sur des souches d'*Acinetobacter baumannii* conservées au laboratoire durant l'année 1993. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques :

-technique de dilution de l'antibiotique en milieu solide

-technique de diffusion en gradient de concentration de l'antibiotique (système Epsilomètre ou bandelette E test®).

Ensuite nous avons décidé d'étudier le comportement en bactériostase de l'association de deux antibiotiques en calculant le FIC index (Fractional Inhibitory Concentration index).

II MATERIEL ET METHODES

II-1) Matériel

II-1-1) Recueil des souches bactériennes

a) Identification

Le diagnostic d'*Acinetobacter baumannii* a été posé d'après les caractères suivants :

- Grosses colonies convexes, luisantes et blanchâtres sur milieux usuels.
- Coccobacilles immobiles, Gram négatif, oxydase - et catalase +, à l'examen direct.
- Caractère aérobic strict en milieu d'Hajna
- En Entérotube® : oxydation de l'arabinose avec acidification du milieu. Avec ce système, la réaction du glucose ne peut être prise en compte car elle se produit en anaérobiose.
- Croissance à 41°C sur gélose au bromocrésol pourpre (B.C.P.).
- Recherche de γ GT (γ glutamyl transférase). C'est un caractère différentiel entre *A. baumannii* (γ GT +) et *A. junii* (γ GT -) car ces deux espèces se développent à 41°C.

b) Mode de sélection des souches

A partir des souches d'*A. baumannii* conservées au laboratoire, nous avons choisi 80 d'entre elles isolées au cours de l'année 1993 de différents sites chez des patients, qu'ils soient colonisés ou infectés, admis au B.R.R..

Nous avons réalisé un antibiogramme standard. La sélection a été basée sur la lecture des diamètres d'inhibition de six antibiotiques (ticarcilline, imipénème, gentamicine, nétilmicine, tobramycine et amikacine) ainsi chaque souche a été rattachée à l'une des trois classes thérapeutiques sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R).

Pour étudier le comportement des β -lactamines, nous avons sélectionné deux groupes de souches : toutes les souches résistantes ou intermédiaires à

l'imipénème et certaines souches sensibles à l'imipénème, parmi ces dernières nous avons retenu des souches sensibles à la ticarcilline et des souches résistantes.

Pour préciser le comportement des aminosides, nous avons choisi des souches résistantes à tous les aminosides et des souches sensibles à au moins un aminoside.

De cette façon 43 souches ont été retenues.

II-2) Méthodes

II-2-1) L'antibiogramme standard

a) Principe

L'antibiogramme standard est une technique de diffusion [14] en milieu gélosé de Mueller Hinton à partir de disques imprégnés d'antibiotiques dont la charge a été définie par le Comité Français de l'Antibiogramme (C.F.A.). La lecture des diamètres d'inhibition comparés aux diamètres critiques publiés par le C.F.A. permet d'affecter les bactéries à l'une des classes thérapeutiques S, I ou R et de choisir une antibiothérapie adaptée. Cette méthode est la plus ancienne des techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Elle est utilisée en routine au laboratoire.

b) Mode opératoire

Préparation de l'inoculum : à partir d'une culture (en phase stationnaire) de 24 heures sur milieu gélosé, trois colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans un tube de 2 ml de milieu de Mueller Hinton liquide. La suspension obtenue est comparée visuellement à l'étalon 0,5 de l'échelle de Mc Farland correspondant à 10^8 bactéries/ml. Une dilution au 1/100 en milieu de Mueller Hinton liquide permet de ramener la suspension à environ 10^6 bactéries/ml qui est la quantité recommandée pour réaliser un antibiogramme.

Ensemencement : la technique retenue est la technique de Kirby Bauer qui s'effectue par écouvillonnage. Un écouvillon sec et stérile est plongé dans la suspension puis il est frotté à la surface de la gélose en tournant la boîte afin de répartir uniformément l'inoculum.

Dépôt des antibiotiques : les disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés sur la gélose à l'aide d'un conteneur-distributeur. Onze antibiotiques ont été testés dans notre étude :

- β -lactamines : ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline, pipéracilline-tazobactam, ceftazidime, sulbactam et imipénème

-aminosides : gentamicine, tobramycine, amikacine et nétilmicine.

Les boîtes sont mises à incuber 18 à 24 heures à 37°C au plus tard 15 minutes après les avoir inoculées.

Lecture : les diamètres d'inhibition sont mesurés avec un pied à coulisse en considérant la décroissance brutale de la culture.

II-2-2) Concentration Minimale Inhibitrice : C.M.I.

a) Principe

La C.M.I. est la plus faible concentration d'une gamme d'antibiotique dilué de demi en demi qui entraîne une inhibition de toute croissance bactérienne visible. Les résultats obtenus sont quantitatifs mais peuvent être rendus qualitatifs par affectation de la bactérie à l'une des trois classes thérapeutiques sensible, intermédiaire ou résistante en se référant aux concentrations critiques publiées par le C.F.A.. C'est une méthode de référence pour la mesure de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

b) Mode opératoire

Préparation de l'inoculum : pour la détermination des C.M.I. par la technique des dilutions, il est nécessaire de travailler avec un inoculum en phase exponentielle de croissance.

A partir d'un bouillon de 18 heures, un milieu de Mueller Hinton liquide est ensemencé. Le bouillon obtenu est mis à incuber 3 à 5 heures au bain marie agité jusqu'à détection d'une légère opalescence correspondant à environ 10^7 bactéries/ml. L'inoculum final à 10^6 bactéries/ml est obtenu en diluant 1 ml du bouillon dans 10ml de milieu de Mueller Hinton liquide.

Des inoculum de souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont également préparés afin de valider la technique.

Préparation de la gamme d'antibiotique : Une solution mère de 2560 mg/l est préparée dans de l'eau distillée ou dans un solvant approprié puis diluée de demi en demi jusqu'à la concentration de 1,25 mg/l. Dans chaque boîte de Pétri, 2 ml de chacune des dilutions et 18 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont mélangés. Les concentrations finales obtenues s'étendent de 256 mg/l à 0,125mg/l.

Les gammes de dilutions sont préparées pour l'ensemble des onze antibiotiques testés dans la technique de l'antibiogramme standard.

Ensemencement des boîtes : les boîtes ainsi préparées sont ensemencées à l'aide de l'ensemencement de Steers qui est un inoculateur multiple composé de 25 tiges métalliques pouvant déposer chacune des spots de 10 μ l. Lorsque l'inoculum est à 10^6 bactéries/ml, le dépôt d'un spot correspond à 10^4 bactéries. 25 souches différentes peuvent être inoculées sur la même boîte. L'incubation dure 24 heures à 37° C.

Lecture : la C.M.I. correspond à la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de culture visible ; la présence de 1 à 3 colonies n'est pas prise en compte ainsi qu'une croissance très fine à l'endroit du dépôt. Les C.M.I. obtenues pour les souches de référence ATCC d'*E. coli*, *S. aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* doivent correspondre aux valeurs publiées par le C.F.A.

II-2-3) Epsilon test ou E test®

a) Principe

E test®, aussi appelé système epsilomètre, est une technique quantitative qui détermine la C.M.I. ; c'est une combinaison entre la méthode de référence définie plus haut, qui est basée sur la dilution de l'antibiotique en milieu gélosé, et la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion. E test® diffère de cette dernière par la formation d'un gradient de concentration en antibiotique à stabilité durable [7].

b) Mode opératoire

Préparation de l'inoculum : l'inoculum est obtenu à partir d'une culture bactérienne, en phase stationnaire, de 18 heures sur gélose non inhibitrice. Pour cela 5 à 10 colonies sont prélevées et mises en suspension dans un bouillon de Mueller Hinton liquide. La suspension réalisée doit avoir une opacité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de Mc Farland (10^8 bactéries/ml).

Ensemencement : l'inoculum est réparti par écouvillonnage sur une gélose de Mueller Hinton, ensuite les boîtes sont mises à sécher 10 minutes à l'étuve avant d'appliquer le E test®.

Application de la bandelette E test® : E test® est constitué d'une fine bandelette de plastique inerte et non poreux de 5 mm sur 50 mm. Sur une face un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique est immobilisé, il couvre une zone continue allant de 0,016 à 256 mg/l correspondant à 20 dilutions conventionnelles. Sur l'autre face sont imprimés les différents points de la gamme.

A l'aide d'une pince stérile, la bandelette est appliquée sur la géloseensemencée en partant du centre vers la périphérie, elle doit être parfaitement en contact avec la gélose. Dès lors il se produit un relargage immédiat de l'antibiotique dans le milieu et un gradient de concentration est créé directement le long de la bandelette. Les boîtes sont mises à incuber 24 heures à 37 °C.

Nous n'avons pu tester que les bandelettes d'antibiotiques mises à notre disposition : imipénème, ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline, pipéracilline-tazobactam et ceftazidime.

Nous n'avons pas expérimenté le E test® pour toutes les souches. 27 d'entre elles ont été retenues pour tester l'imipénème et 21 pour les autres antibiotiques.

Lecture : après incubation, on observe une zone d'inhibition en forme d'ellipse répartie symétriquement de chaque côté de la bandelette, le bord de cette zone est perpendiculaire au support gradué. A ce point d'intersection, la concentration de l'antibiotique interrompt la croissance. Cette concentration est lue directement sur la bandelette graduée, elle correspond à la C.M.I..

II-2-4) Fractional Inhibitory Concentration index ou

FIC index

a) Principe

Le FIC index est une valeur qui permet de quantifier l'effet bactériostatique de l'association de deux antibiotiques [15]. La méthode est basée sur la technique de l'échiquier où chaque concentration d'un des antibiotiques est associée à une concentration de l'autre antibiotique selon un schéma carré représenté ci-dessous.

		ANTIBIOTIQUE B (mg/l)					
		0	0,5	1	2	4	
0							
0,5							
1							
2							
4							

ANTIBIOTIQUE A (mg/l)

La technique est réalisée en milieu liquide dans des microplaques. La distribution des antibiotiques dans les puits suit le schéma carré. Après incubation, on recherche dans chaque rangée et chaque colonne de la microplaque la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas de croissance visible.

La concentration obtenue dans la première rangée indique la C.M.I. de l'antibiotique B et celle de la première colonne détermine la C.M.I. de l'antibiotique A. Les autres rangées indiquent les C.M.I. de B en présence des différentes concentrations de A ; les autres colonnes déterminent les C.M.I. de A en présence des différentes concentrations de B.

b) Mode opératoire

Pour notre étude nous avons adapté la technique réalisée habituellement en milieu liquide, à une technique en milieu solide gélosé. Chaque puits de la microplaque est remplacé par une boîte de Pétri.

ANTIBIOTIQUE B (mg/l)

	0	0,5	1	2	4	8
0		+	+	+	+	- <i>CMI B</i>
0,5	+	+	+	+	+	- f(B)=8/8 f(A)=0,5/4 fic=1,125
1	+	+	+	+	+	- f(B)=8/8 f(A)=1/4 fic=1,25
2	+	+	+	+	- f(B)=4/8 f(A)=2/4 fic=1	-
4	- <i>CMI A</i>	+	+	- f(B)=2/8 f(A)=4/4 fic=1,25	-	-
8	-	- f(B)=0,5/8 f(A)=8/4 fic=2,06	- f(B)=1/8 f(A)=8/4 fic=2,125	-	-	-

ANTIBIOTIQUE A (mg/l)

Tableau n° 8

+: croissance bactérienne, - : absence de croissance.
f(A) : FIC (A), f(B) : FIC (B), fic : FIC index

Préparation des gammes de dilution d'antibiotiques. Les concentrations initiales de chaque antibiotique sont préparées de manière identique à la technique de détermination des C.M.I. par dilution, elles doivent être 20 fois plus concentrées que les concentrations finales désirées. Dans chaque boîte de Pétri 1 ml de A, 1 ml de B et 18 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont mélangés. Toutes les concentrations de A et de B sont ainsi combinées entre elles comme dans le schéma carré.

Choix des antibiotiques et des souches à tester. Les résultats obtenus avec les trois méthodes : antibiogramme standard, détermination des C.M.I. par dilution et par le système epsilomètre, nous ont permis de guider nos choix. Parmi les antibiotiques utilisés dans ces techniques, nous en avons retenu trois qui nous semblaient intéressants pour réaliser des associations : l'imipénème, le sulbactam et la gentamicine. Les FIC index ont été calculés pour deux associations : imipénème-gentamicine et imipénème-sulbactam.

Les souches testées ont été choisies de manière à représenter un large éventail des profils de résistance vis à vis de ces trois antibiotiques.

Pour l'association imipénème-gentamicine, 16 souches ont été retenues : n°2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 21, 22, 24, 26, 31 et 37.

Pour l'association imipénème-sulbactam, 20 souches ont été testées n°1, 3, 5, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 20, 24, 25, 28, 33, 34, 36, 37, 38, 39 et 40.

Préparation de l'inoculum et ensemencement des boîtes : les inoculum en phase exponentielle sont à 10^6 bactéries/ml, ils sont obtenus de la même façon que pour la détermination des C.M.I. par dilution.

L'ensemencement est réalisé grâce à l'ensemencement de Steers et 25 souches sont inoculées sur la même boîte. L'adaptation de la technique au milieu solide nous permet donc de tester plusieurs souches à la fois.

L'incubation dure 24 heures à 37°C.

Lecture : les résultats sont reportés pour chaque souche suivant un schéma carré. Pour chaque concentration de A on recherche la C.M.I. de B (exemple dans le tableau n°8).

c) Calcul et interprétation

Le FIC index est la somme des fractions de concentrations inhibitrices de A et de B respectivement désignées : FIC (A) et FIC (B).

Le FIC (A) est le rapport de la C.M.I. de A en présence de B sur la C.M.I. de A

le FIC (B) est celui de la C.M.I. de B en présence de A sur la C.M.I. de B.

Les valeurs des fractions de concentrations sont indiquées dans le tableau n°8.

Leur somme correspond au FIC index, la valeur la plus basse est considérée comme caractéristique de l'association.

Une association est qualifiée de :

-*SYNERGIQUE* pour un FIC index $<$ ou $=$ 0,75

-*INDIFFERENTE* si $1 <$ FIC index $>$ ou $=$ 2

-*ANTAGONISTE* si le FIC index $>$ 2.

Dans l'exemple ci-contre, il n'y a pas de synergie pour l'association de l'antibiotique A avec l'antibiotique B.

III RESULTATS

III-1) Antibiogramme standard, C.M.I. par dilution en milieu gélosé et C.M.I. par système epsilomètre E test®

Nous avons regroupé les résultats obtenus avec ces trois techniques dans les annexes p.80.

III-1-1) Correlations entre les méthodes utilisées

A partir des diamètres et C.M.I. obtenus nous avons établi dans chaque technique et pour chaque antibiotique l'appartenance des souches aux catégories sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I) en se référant aux valeurs publiées par le CFA. Nous avons comparé les résultats de l'antibiogramme standard et du E test® à la technique de référence, qui est la détermination des C.M.I. en milieu gélosé par dilution, en établissant le nombre de concordances et de discordances.

Parmi ces dernières on distingue les discordances mineures lorsque la souche est S ou R avec une des méthodes et I avec l'autre. On parle de discordances majeures si la bactérie est S pour une technique et R pour l'autre.

Les résultats sont représentés dans les tableaux n°9 et 10 p.55 ; le sulbactam n'y figure pas car aucune valeur critique n'est actuellement définie.

**Comparaison des résultats obtenus par antibiogramme standard versus
méthode de référence des C.M.I. par dilution en milieu gélosé**

Résultats relevés pour 43 souches

ANTIBIOTIQUES	CONCORDANCES	DISCORDANCES	
		Mineures	Majeures
Ticarcilline	33	10	0
Ticarcilline et ac. clavulanique	35	8	0
Piperacilline	34	9	0
Piperacilline et tazobactam	37	6	0
Ceftazidime	27	16	0
Imipénème	41	2	0
Gentamicine	31	12	0
Nétilmicine	41	2	0
Tobramycine	37	6	0
Amikacine	40	2	1

Tableau n°9

**Comparaison des résultats obtenus par le E test® versus méthode de
référence des C.M.I. par dilution en milieu gélosé**

Résultats relevés pour 27 souches avec l'imipénème et 21 avec les autres antibiotiques

ANTIBIOTIQUES	CONCORDANCES	DISCORDANCES	
		Mineures	Majeures
Ticarcilline et ac. clavulanique	20	1	0
Piperacilline	20	1	0
Piperacilline et tazobactam	17	4	0
Ceftazidime	14	7	0
Imipénème	25	2	0

Tableau n°10

Le tableau n°9 p.55 nous montre que les discordances majeures sont absentes pour tous les antibiotiques mis à part pour l'amikacine (une seule souche discordante).

Dans le tableau n°10 p.55, la comparaison système epsilomètre et C.M.I. par dilution en milieu gélosé n'a montré aucune discordance majeure.

Des discordances mineures ont été mises en évidence dans les deux tableaux, leur nombre varie selon l'antibiotique considéré.

III-1-2) Exploitation des résultats

a) β -lactamines

- Répartition des 43 souches en fonction des valeurs des C.M.I. (méthode par dilution) : tableau n°11 p.58

- Ticarcilline, ticarcilline et acide clavulanique :

Nous n'avons pas observé de différence de répartition des souches entre la ticarcilline et l'association ticarcilline-acide clavulanique : les souches ticarcilline sensibles sont ticarcilline-acide clavulanique sensibles et celles résistantes à la ticarcilline le sont aussi pour l'association (C.M.I. élevées de 128 à 256 mg/l).

- Pipéracilline, pipéracilline et tazobactam

Nous avons constaté une nette diminution des C.M.I. de l'association pipéracilline-tazobactam pour les souches intermédiaires à la pipéracilline passant de 16 à 0,125 mg/l ; les souches résistantes à la pipéracilline, le sont restées malgré l'addition du tazobactam.

- Ceftazidime

La majorité des souches est intermédiaire ou résistante. Nous avons pu noter que le tazobactam restaure l'activité de la pipéracilline pour certaines souches intermédiaires à la ceftazidime.

- Sulbactam

Dans la première partie de notre travail, nous n'avons pas testé le sulbactam en association, nous pouvons ainsi étudier son activité intrinsèque vis à vis d'*A.baumannii*.

Les valeurs des C.M.I. du sulbactam des souches résistantes à la ticarcilline sont plus élevées (8 à 16 mg/l) que celles des souches sensibles ou intermédiaires, pour ces dernières les C.M.I. varient de 1 à 4 mg/l.

- Imipénème

La détermination des C.M.I. par la méthode des dilutions n'a mis en évidence aucune souche résistante. Les C.M.I. les plus élevées étant de 4 mg/l ce qui correspond à des souches intermédiaires. De même avec la méthode du E test® aucune souche n'a été résistante, les C.M.I. s'élevaient à 8 mg/l. Par la technique de l'antibiogramme standard, nous avons détecté seulement une souche résistante de diamètre égal à 15 mm.

Nous avons constaté que les souches intermédiaires à l'imipénème étaient souvent résistantes aux autres β -lactamines et rarement intermédiaires, de plus elles présentaient toujours des C.M.I. élevées au sulbactam.

b) aminosides

- Répartition des souches (tableau n°12 p.59).

- Pour l'ensemble des souches testées, nous avons observé que les valeurs des C.M.I. de l'amikacine et de la nétilmicine étaient plus élevées que celles de la tobramycine et de la gentamicine ainsi de nombreuses souches intermédiaires à la gentamicine étaient résistantes aux autres aminosides.

Les souches résistantes ou intermédiaires aux aminosides étaient, pour la plupart, résistantes ou intermédiaires aux β -lactamines.

Répartition des valeurs des C.M.I. des β -lactamines

Résultats obtenus avec la méthode de référence

Etude sur 43 souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées au B.R.R. en 1993

Valeurs des C.M.I. : (en mg/l)	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
ANTIBIOTIQUES												
Ticarcilline				1	3	3	6	3	1	14	15	
Ticarcilline et ac. clavulanique				1	8	3	2			14	15	
Piperacilline						7	4	4	6	1	25	
Piperacilline et tazobactam	9					3	1	1	4		25	
Ceftazidime					1	4	5	1	13	5	8	6
Imipénème	8	2	2	6	7	18						
Sulbactam				7	3	3	12	14	4			

 Zones critiques

Absence de valeurs critiques disponibles pour le sulbactam

Tableau n°11

Répartition des valeurs des C.M.I. des aminosides

Résultats obtenus avec la méthode de référence

Etude sur 43 souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées au B.R.R. en 1993

Valeurs des C.M.I. (en mg/l)	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
ANTIBIOTIQUES												
Amikacine			2	7	1	1	1		3	8	19	2
Nétilmicine		2		2	6		2	1			3	27
Tobramycine		4	6	2	1	1	3	19	5	1		1
Gentamicine	1	4	3	2	1	4	19	5				4

 Zones critiques

Tableau n° 12

III-2) Résultats FIC INDEX

Association Imipénème et gentamicine (16 souches testées)

	FIC imp	FIC genta.	FIC index	CMI imp	CMI genta
N° de souches					
2	0,06	0,25	0,31	4	8
3	0,06	0,5	0,56	2	4
6	0,03	0,25	0,28	4	8
9	0,03	0,25	0,28	4	8
10	0,06	0,25	0,31	2	8
11	0,25	0,25	0,5	4	8
12	0,125	0,25	0,375	4	8
13	0,06	0,25	0,31	2	8
15	0,06	0,25	0,31	4	8
17	0,25	0,25	0,5	2	16
21	0,06	0,25	0,31	4	4
22	0,25	0,5	0,75	4	2
24	0,5	0,12	0,17	0,25	0,25
26	0,5	0,24	0,74	0,125	0,125
31	0,5	0,06	0,56	1	256
37	0,5	0,24	0,74	0,125	0,5

Tableau n°13

Association Imipénème et sulbactam (20 souches testées)

	FIC imp	FIC sulb.	FIC index	CMI imp	CMI sulb.
N° de souches					
1	0,125	0,125	0,25	0,25	16
3	0,03	0,25	0,28	2	8
5	0,125	0,25	0,375	4	16
9	0,125	0,25	0,375	4	16
10	0,03	0,25	0,28	2	8
12	0,125	0,25	0,375	4	32
13	0,03	0,25	0,28	2	32
16	0,03	0,25	0,28	2	8
17	0,25	0,25	0,5	2	16
20	0,125	0,25	0,375	4	16
24	0,5	0,25	0,75	0,25	1
25	0,25	0,5	0,75	0,125	1
28	0,06	0,125	0,185	0,5	4
33	0,5	0,25	0,75	0,5	2
34	0,5	0,5	1	0,125	2
36	0,03	0,125	0,155	0,125	1
37	0,5	0,25	0,75	0,125	1
38	0,03	0,25	0,28	1	8
39	0,03	0,125	0,155	0,125	1
40	0,06	0,25	0,31	2	16

Tableau n°14

(imp : imipénème, genta : gentamicine, sulb. : sulbactam)

IV DISCUSSION

IV-1) antibiogramme, C.M.I. par dilution et E test®

IV-1-1) Critiques des méthodes utilisées

a) Point de vue pratique

La technique de l'antibiogramme standard, réalisée en routine, est simple et facile à mettre en oeuvre. Toutefois une méthodologie rigoureuse est nécessaire pour obtenir un résultat qualitatif fiable.

Pour des études plus précises, il est indispensable d'avoir recours à la détermination des C.M.I.. La pratique des deux techniques de détermination des C.M.I., par dilution en milieu gélosé et par système epsilomètre, nous a permis de constater que le E test® était beaucoup plus simple et plus rapide d'emploi que la technique des dilutions.

Le système epsilomètre est une technique récente, il est aujourd'hui utilisé pour tester la sensibilité aux antibiotiques de nombreuses espèces bactériennes [7]. Il permet une quantification exacte et directe de la sensibilité aux antibiotiques donnant des valeurs des C.M.I. plus précises que les autres méthodes. Sa fiabilité et sa simplicité de mise en oeuvre en font un outil utilisable au coup par coup. Cependant la limitation à une bandelette par boîte diminue la souplesse d'utilisation pour l'application simultanée de plusieurs antibiotiques ou l'étude d'un nombre important de souches.

Ainsi pour étudier plusieurs souches, il est sans doute préférable d'utiliser la méthode des dilutions, plus économique, car elle permet de tester 25 souches à la fois et toute une gamme d'antibiotiques.

b) Concordances et discordances

Les proportions de discordances mineures entre antibiogramme standard et C.M.I. par dilution en milieu gélosé sont équivalentes à celles observées entre E test® et C.M.I. par dilution en milieu gélosé. Elles varient selon l'antibiotique. La plupart des discordances mineures entre antibiogramme et C.M.I., se situent aux bornes des valeurs critiques lorsque la C.M.I. passe de sensible à intermédiaire ou d'intermédiaire à résistant à une dilution près.

La comparaison entre antibiogramme et C.M.I. par dilution (tableau n°9 p.55), nous permet de constater que les discordances majeures sont absentes pour tous les antibiotiques excepté pour l'amikacine (une seule discordance).

Les résultats des C.M.I. par E test® et C.M.I. par dilutions n'ont mis en évidence aucune discordance majeure (tableau n°10 p.55).

Cela nous permet de penser que ces deux méthodes sont bien corrélées.

IV-1-2) Analyse des résultats

a) Comportement face aux β -lactamines

D'après les mécanismes de résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux β -lactamines décrits dans la littérature [18];[37], nous avons tenté de préciser le comportement de 43 souches.

Notre étude nous a conduit :

- à vérifier l'activité de l'imipénème
- à discuter l'intérêt des inhibiteurs de β -lactamases dans leur association avec la ticarcilline et la pipéracilline mais aussi l'intérêt de l'activité propre du sulbactam sur cette espèce.

•Apport de l'imipénème

Pour notre travail, nous avons décidé de retenir toutes les souches résistantes ou intermédiaires à l'imipénème avec la méthode de l'antibiogramme standard. Les résultats obtenus avec la détermination des C.M.I. par dilution confirment ceux qui avaient été établis par le laboratoire lors de l'isolement des souches : les C.M.I. étant comprises entre 4 et 8 mg/l.

Depuis la découverte de souches à sensibilité diminuée à l'imipénème, de nombreux auteurs ont étudié leurs C.M.I.. Par exemple, Urban et coll. [62] obtiennent en 1989 des C.M.I. pour l'imipénème à 16 mg/l, Craig [69], en 1990, trouve des valeurs de 8 à 16 mg/l. Dans l'ensemble, les valeurs des C.M.I. à l'imipénème fournies par la littérature restent peu élevées et nos résultats sont analogues.

- Apport des inhibiteurs de β -lactamases

L'acide clavulanique associé à la ticarcilline restaure l'activité de la ticarcilline sur les souches produisant des pénicillinases [63]. Dans notre étude, l'absence de diminution des C.M.I. entre la ticarcilline seule et l'association ticarcilline-acide clavulanique sur les souches résistantes, nous conduit à penser que l'acide clavulanique n'est pas ici d'un grand intérêt. Il s'agit sans doute de souches produisant une céphalosporinase (C.M.I. élevées à la ceftazidime) en plus d'une pénicillinase. Pour de telles souches, Joly Guillou et coll. ont donné des valeurs moyennes des C.M.I. : ticarcilline > 128 mg/l, ticarcilline-acide clavulanique 102 mg/l et ceftazidime 64 mg/l [37].

Le tazobactam associé à la pipéracilline peut améliorer l'activité de cette dernière sur des souches produisant un certain type de céphalosporinase [53].

Dans notre étude, la nette diminution des C.M.I. entre pipéracilline seule et pipéracilline-tazobactam, notamment pour certaines souches intermédiaires à la ceftazidime, pourrait s'expliquer par la présence d'une céphalosporinase.

- Apport du sulbactam seul

Sur les souches résistantes à la ticarcilline, le sulbactam n'a pas d'effet propre (C.M.I. de 8 à 32 mg/l), par contre lorsque la ticarcilline est sensible, les C.M.I. sont diminuées (C.M.I. de 1 à 4 mg/l). Les résultats obtenus par Vallée [63] sont analogues, il constate que l'activité intrinsèque du sulbactam vis à vis des souches d'*A. baumannii* s'exerce uniquement sur les souches sensibles à la ticarcilline.

b) Comportement face aux aminosides

Sur les deux groupes de souches sélectionnées pour étudier le comportement des aminosides, la gentamicine est l'aminoside pour lequel nous avons obtenu les meilleurs résultats.

Acinetobacter baumannii est capable de réunir plusieurs mécanismes de résistance vis à vis des différentes familles d'antibiotiques. Ainsi le groupe de souches résistantes aux aminosides se superpose à celui des souches les plus résistantes aux β -lactamines.

Il nous est apparu difficile d'interpréter les résultats obtenus avec les aminosides étant donné la diversité des enzymes impliquées dans les mécanismes de résistance (tableau n°6 p.37) et la variation, d'une étude à une autre, de la sensibilité aux aminosides (tableau n°2 p.27).

Vis à vis d'*Acinetobacter baumannii*, l'intérêt de l'utilisation des aminosides réside surtout dans leurs associations avec les β -lactamines comme nous le montre l'étude de Ygout et coll. [70] où les aminosides sont testés seuls puis en association.

IV-2) FIC index

Un des buts de l'association d'antibiotiques est d'obtenir une action synergique à partir de deux antibiotiques qui pris séparément ont une activité réduite. Cela est particulièrement recherché pour les bactéries multirésistantes. Sur les souches d'*Acinetobacter baumannii* à sensibilité diminuée à l'imipénème l'étude d'association d'antibiotiques nous semblait donc toute indiquée.

IV-2-1) Critiques de la méthode utilisée

Le FIC index est rarement décrit dans la littérature [40] et nous n'avons pas retrouvé de publication concernant *Acinetobacter*. En effet les associations d'antibiotiques sont réalisées, *in vitro*, le plus souvent avec des méthodes de bactéricidie. La détermination de l'activité bactéricide d'une association sur un inoculum, à différents temps 3, 6 et 24 heures constitue la méthode du time killing curve [15];[71].

La technique du FIC index que nous avons adaptée nous a permis de quantifier l'effet bactériostatique de l'association de deux antibiotiques. Les modifications effectuées à partir de la méthode de l'échiquier, nous ont permis de tester plusieurs souches à la fois ainsi que l'ensemble des gammes de concentrations des deux antibiotiques.

IV-2-2) Choix des antibiotiques et des souches

Le FIC index a été déterminé pour deux associations : imipénème-sulbactam et imipénème-gentamicine. Plusieurs raisons expliquent ce choix :

-les valeurs les plus élevées des C.M.I. de l'imipénème par dilution en milieu gélosé étaient à 4 mg/l, de plus cette molécule est reconnue comme la plus active vis à vis d'*Acinetobacter baumannii*.

-la gentamicine est l'aminoside pour lequel des souches étaient intermédiaires alors qu'elles étaient résistantes pour tous les autres aminosides testés.

-le sulbactam (C.M.I. s'élevant à 32 mg/l) exerce sur cette espèce bactérienne à la fois une activité d'inhibiteur de β -lactamase et une activité intrinsèque.

Pour tester ces associations nous avons sélectionné plusieurs groupes de souches en fonction de leur sensibilité aux trois antibiotiques.

Pour l'association imipénème-gentamicine, ont été retenues les souches résistantes ou intermédiaires aux deux antibiotiques, sensibles aux deux, sensibles à l'imipénème et résistantes ou intermédiaires à la gentamicine.

Pour l'association imipénème-sulbactam, les souches intermédiaires à l'imipénème et résistantes au sulbactam, sensibles à l'imipénème et sensibles ou résistantes au sulbactam ont été sélectionnées.

IV-2-3) Commentaires des résultats

Pour la souche n°34, l'association imipénème et sulbactam est indifférente (FIC index égal à 1). Les C.M.I. des deux antibiotiques (imipénème : 0,125mg/l sulbactam : 1mg/l) montrent que ces antibiotiques sont actifs séparément.

Pour toutes les autres souches étudiées le FIC index est inférieur à 0,75. Les associations imipénème-gentamicine et imipénème-sulbactam sont donc synergiques.

Il existe pour toutes les souches intermédiaires à l'imipénème que nous avons testées, une association synergique.

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* en bactériostase permettent de penser que l'association de deux antibiotiques peut être tentée en thérapeutique pour des souches multirésistantes.

Par la méthode de détermination de la cinétique de bactéricidie, Caillon et coll. [71] ont testé l'activité bactéricide du sulbactam seul et associé à l'imipénème sur des souches d'*Acinetobacter baumannii* ; les résultats ont montré qu'il existait des associations synergiques vis à vis de souches ticarcilline et sulbactam sensibles et aussi ticarcilline et sulbactam résistantes.

CONCLUSION

L'étude des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées au bloc de réanimation respiratoire en 1993, a confirmé la multirésistance de cette espèce bactérienne.

Les deux techniques que nous avons utilisées pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices : en milieu liquide et par le système epsilomètre, ont été bien corrélées.

Nos résultats ont montré que les souches à sensibilité diminuée à l'imipénème sont des souches très souvent résistantes et rarement intermédiaires aux autres β -lactamines, au sulbactam et aux aminosides.

Deux associations d'antibiotiques : imipénème-gentamicine et imipénème-sulbactam ont été testées en utilisant une technique de détermination du FIC index en bactériostase, dérivée de la technique de l'échiquier.

Nos résultats ont montré que les associations imipénème-gentamicine et imipénème-sulbactam étaient synergiques sur les souches multirésistantes.

Il serait intéressant d'utiliser cette technique de détermination du FIC index pour tester d'autres associations d'antibiotiques telles que le sulbactam ou les aminosides avec la ticarcilline, la pipéracilline ou les céphalosporines de troisième génération. Ces associations peuvent en effet représenter un gain important dans le traitement des infections nosocomiales à *Acinetobacter*.

REFERENCES**BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] . Amor, A., Barguelli, F., Othmani, S. and Bahri, M.
Infections à *Acinetobacter baumannii* et apport bactériologique.
Sem. Hôp. Paris (1993) 69 (24) : 732-35
- [2] . Anstey, N.M., Currie, B.J. and Withnall, K.M.
Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in the Northern Territory of Australia.
Clin. Infect. Dis. (1992) 14 (1) : 83-91
- [3] . Aucken, H.M. and Pitt, T.L.
Lipopolysaccharide profile typing as a technique for comparative typing of gram-negative bacteria.
J. Clin. Microbiol. (1993) 31 (5) : 1286-9
- [4] . Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F. and Monteil, H.
Acinetobacter.
dans Bactériologie clinique.
Marketing editors, Ellipses, Paris. (1992) : 102-7
- [5] . Baumann, P., Doudoroff, M. and Stanier, R.Y.
A study of the *Moraxella* group 11 oxidative negative species (genus *Acinetobacter*).
J. Bacteriol. (1968) 95 : 1520-41
- [6] . Bergogne-Berezin, E., Decre, D. and Joly-Guillou, M.L.
Opportunistic nosocomial multiply resistant bacterial infections : their treatment and prevention.
J. Antimicrob. Chemother. (1993) 32 (suppl A) : 39-47
- [7] . BioMédical.
Documentation E test : la méthode la plus simple de détermination de la C.M.I. vraie, antibiogramme et antifongigramme.
BioMédical Diagnostics (1994), editors Bmd sa,
- [8] . Bouvet, P.J. and Grimont, P.A.
Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. and *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*.
Int. J. Syst. Bacteriol. (1986) 36 (2) : 228-40
- [9] . Bouvet, P.J. and Grimont, P.A.
Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*.
Ann. Inst. Pasteur Microbiol. (1987) 138 (5) : 569-78
- [10] . Bouvet, P.J. and Jeanjean, S.
Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*.
Ann. Inst. Pasteur Microbiol. (1989) 140 : 291-9
- [11] . Bouvet, P.J., Jeanjean, S., Vieu, J.F. and Dijkshoorn, L.
Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains.
J. Clin. Microbiol. (1990) 28 (2) : 170-6

- [12] . Buisson, Y., Tran, V.N.G., Ginot, L., Bouvet, P., Schill, H., Driot, L. and Meyran, M.
Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive *Acinetobacter* species : correlation with amikacin usage.
J. Hosp. Infect. (1990) 15 (1) : 83-93
- [13] . Christensen, E.A., Gerner, S.P. and Kristensen, H.
Radiation resistance of clinical *Acinetobacter* spp.: a need for concern?
J. Hosp. Infect. (1991) 18 (2) : 85-92
- [14] . Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
Recommandation du CA-SFM.
Bull. Soc. Fr. Microbiol. (1993) 8 (3) : 156-66
- [15] . Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A. and Sirot, J.
L'antibiogramme.
(1985) mpc-vigot, editors
- [16] . Dib, C., Zhou, X.Y., Trias, J., Gutmann, L. and Jarlier, V. .
Combined mechanism of resistance to carbapenems in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.
34 th ICAAC, (1994) Abstract C 66: 89
- [17] . Dijkshoorn, L., Aucken, H.M., Gerner Smidt, S.P., Kaufmann, M.E., Ursing, J. and Pitt, T.L.
Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks.
J. Clin. Microbiol. (1993) 31 (3) : 702-5
- [18] . Gehrlein, M., Leying, H., Cullmann, W., Wendt, S. and Opferkuch, W.
Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins.
Chemotherapy (1991) 37 (6) : 405-12
- [19] . Gerner, S.P.
Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex.
J. Clin. Microbiol. (1992) 30 (10) : 2680-5
- [20] . Gerner, S.P. and Frederiksen, W.
Acinetobacter in Denmark : I, taxonomy, antibiotic susceptibility and pathogenicity of 112 clinical strains.
A. P. M. I. S. (1993) 101 : 815-25
- [21] . Gerner, S.P. and Tjernberg, I.
Acinetobacter in Denmark : II, molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex.
A. P. M. I. S. (1993) 101 : 826-32
- [22] . Gerner, S.P., Tjernberg, I. and Ursing, J.
Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species.
J. Clin. Microbiol. (1991) 29 (2) : 277-82

- [23] . Go, E.S., Urban, C., Burns, J., Kreiswirth, B., Eisner, W., Mariano, N., Mosinka-Snipas, K. and Rahal, J.J.
Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymixin B and sulbactam.
Lancet (1994) 344 (12) : 1329-32
- [24] . Godineau-Gauthem, N., Lesage, D., Tessier, F., Kollia, D. and Daguët, G.L.
Acinetobacter calcoaceticus variété *anitratu*s ou *Acinetobacter baumannii* : étude de la sensibilité aux antibiotiques de 65 souches hospitalières.
Med. Maladies Infect. (1988) 2 bis : 124-29
- [25] . Gouby, A., Carles, N.M., Bouziges, N., Bourg, G., Mesnard, R. and Bouvet, P.J.
Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*.
J. Clin. Microbiol. (1992) 30 (6) : 1588-91
- [26] . Graser, Y., Klare, I., Halle, E., Gantenberg, R., Buchholz, P., Jacobi, H.D., Presber, W. and Schonian, G.
Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting.
J. Clin. Microbiol. (1993) 31 (9) : 2417-20
- [27] . Hercouët, H., Bousser, J., Donnio, P.Y. and Avril, J.L.
[In vitro effect of antibiotics against hospital strains of *Acinetobacter baumannii*].
Pathol. Biol. Paris (1989) 37 (5 bis) : 612-6
- [28] . Hood, J. and Amyes, S.G.B.
A novel method for identification and distinction of the beta lactamase of the genus *Acinetobacter*.
J. Appl. Bacteriol. (1989) 67 : 157-163
- [29] . Jawad, A., Hawkey, P.M., Heritage, J. and Snelling, A.M.
Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp and comparison with Herellea Agar and Holton's Agar.
J. Clin. Microbiol. (1994) 32 (10) : 2353-8
- [30] . Joly-Guillou, M.L. and Bergogne Berezin, E.
Présence d'une beta lactamase à spectre élargi chez *Acinetobacter baumannii*.
Presse Med. (1990) 19 (14) : 672-3
- [31] . Joly-Guillou, M.L., Bergogne-Berezin, E. and Moreau, N.
Enzymatic resistance to beta lactams and aminoglycosides in *Acinetobacter calcoaceticus*.
J. Antimicrob. Chemother. (1987) 20 (6) : 773-6
- [32] . Joly-Guillou, M.L., Bergogne-Berezin, E. and Vieu, J.F.
Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des *Acinetobacter* en milieu hospitalier bilan de 5 années.
Presse Med. (1990) 19 (8) : 357-61

- [33] . Joly-Guillou, M.L., Bergogne-Berezin, E. and Vieu, J.F.
A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter* spp.
J. Hosp. Infect. (1990) 16 (1) : 49-58
- [34] . Joly-Guillou, M.L., Decre, D. and Bergogne-Berezin, E.
Infections nosocomiales à *Acinetobacter*. Surveillance épidémiologique hospitalière.
Bull. Epid. Hebd. (1992) 45 : 211-2
- [35] . Joly-Guillou, M.L., Decre, D., Wolff, M. and Bergogne-Berezin, E. .
Infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* en unités de soins intensifs en France : problèmes thérapeutiques.
12 th Interdisciplinary Meeting on Anti-Infectious Chemotherapy, Paris, France
(1992) Abstract C9: 144
- [36] . Joly-Guillou, M.L., Sollet, J.P., Varache, C. and Bergogne-Berezin, E.
Infections dues à *Acinetobacter baumannii*.
Med. Maladies infect. (1993) 23 : 67-72
- [37] . Joly-Guillou, M.L., Vallee, E., Bergogne-Berezin, E. and Philippon, A.
Distribution of beta lactamases and phenotype analysis in clinical strains of *Acinetobacter calcoaceticus*.
J. Antimicrob. Chemother. (1988) 22 : 597-604
- [38] . Juni, E.
Interspecies transformation of *Acinetobacter* genetic evidence for an ubiquitous genus.
J. Bacteriol. (1972) 112 : 917-931
- [39] . Kitzis, M.D., Goldstein, F.W., Labia, P. and Acar, J.F.
Activité du sulbactam et de l'acide clavulanique seuls et associés sur *Acinetobacter calcoaceticus*.
Ann. Microbiol. (Inst. Past.) (1983) 134 : 163-8
- [40] . Klastersky, J. and Van der Auwera, P.
In vitro activity of sulbactam in combination with various beta-lactam antibiotics.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (1989) 12 : 165 S-169 S
- [41] . Kropec, A., Hubner, J. and Daschner, F.D.
Comparison of three typing methods in hospital outbreaks of *Acinetobacter calcoaceticus* infection.
J. Hosp. Infect. (1993) 23 (2) : 133-41
- [42] . Lambert, T., Gerbaud, G. and Courvalin, P.
Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* spp. due to a new type of 3'-aminoglycoside phosphotransferase.
Antimicrob. Agents Chemother. (1988) 32 (1) : 15-9
- [43] . Muller-Serieys, C., Lesquoy, J.B., Perez, E., Fichelle, A., Boujeois, B., Joly-Guillou, M.L. and Bergogne-Berezin, E.
Infections nosocomiales à *Acinetobacter* : épidémiologie et difficultés thérapeutiques.
Presse Med. (1989) 18 (3) : 107-10
- [44] . Obara, M. and Nakae, T.
Mechanisms of resistance to beta lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*.
J Antimicrob. Chemother. (1991) 28 : 791-800

- [45] . Paton, R., Miles, R.S., Hood, J. and Amyes, S.G.B.
ARI 1 : beta lactamase mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*.
Int. J. Antimicrobiol. Agents (1993) 2 : 81-88
- [46] . Prévost, G., Piémont, Y. and Monteil, H.
Intérêt de l'électrophorèse en champ pulsé en épidémiologie moléculaire.
La Lettre de l'Infectiologue (1993) 8 (8) : 279-83
- [47] . Reboli, A.C., Houston, E.D., Monteforte, J.S., Wood, C.A. and Hamill, R.J.
Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR mediated DNA fingerprinting.
J. Clin. Microbiol. (1994) 32 (11) : 2635-40
- [48] . Rossau, R., Vanlandschroot, A., Gillis, M. and Deley, J.
Taxonomy of Moraxellaceae famnov, a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms.
Int. J. Syst. Bacteriol. (1991) 41 : 310-19
- [49] . Sasal, M., Roig, J., Cervantes, M., Matas, L. and Segura, F.
Acinetobacter species : which do we mean?
Clin. Infect. Dis. (1992) 15 : 748-9
- [50] . Schrocksnadel, H., Florl, C., Dapunt, O. and Dierich, M.P.
Acinetobacter infections, intensive care units and handwashing [letter].
Lancet (1995) 345 (8942) : 121-2
- [51] . Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A. and Pulverer, G.
Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species.
Antimicrob. Agents Chemother. (1993) 37 (4) : 750-3
- [52] . Siegman, I.Y., Bar, Y.S., Gorea, A. and Avram, J.
Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review.
Clin. Infect. Dis. (1993) 17 (5) : 843-9
- [53] . Simor, A.E., Louie, L. and Louie, M.
In vitro susceptibility of *Acinetobacter baumannii* to biapenem, piperacilline, tazobactam and thirteen other antimicrobial agents.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. (1994) 13 (6) : 521-3
- [54] . Sire, J.M., Gras, R.S., Pouedras, P., Mesnard, R., Arvieux, C., Jenek, J., Thomas, R. and Avril, J.L.
Biotyping, ribotyping and esterase electrophoresis as epidemiological tools for *Acinetobacter baumannii*.
Res. Microbiol. (1994) 145 (1) : 27-35
- [55] . Struelens, M.J., Carlier, E., Maes, N., Serruys, E., Quint, W.G.V. and van Belkum, A.
Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii* : outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting.
J. Hosp. Infect. (1993) 25 (1) : 15-32

- [56] . Tankovic, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau, V., Brun-Buisson, C. and Duval, J.
Characterization of a hospital outbreak of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods.
J. Clin. Microbiol. (1994) 32 (11) : 2677-81
- [57] . Tilley, P.A. and Roberts, F.J.
Bacteremia with *Acinetobacter* species : risk factors and prognosis in different clinical settings.
Clin. Infect. Dis. (1994) 18 : 896-900
- [58] . Timsit, J.F., Garrait, V., Misset, B., Goldstein, F.W., Renaud, B. and Carlet, J.
The digestive tract is a major site for *Acinetobacter baumannii* colonization in intensive care unit patients [letter].
J. Infect. Dis. (1993) 168 (5) : 1336-7
- [59] . Tjernberg, I. and Ursing, J.
Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization.
A. P. M. I. S. (1989) 97 : 595-605
- [60] . Traub, W.H.
Serotyping of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and genospecies 3 : detection of additional serovars.
Zbl. Bakt. (1991) 275 : 487-94
- [61] . Traub, W.H. and Spohr, M.
Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter* species (*A. baumannii*, *A. haemolyticus*, genospecies 3, and genospecies 6).
Antimicrob. Agents Chemother. (1989) 33 (9) : 1617-9
- [62] . Urban, C., Go, E.S., Mariano, N., Berger, B.J., Avraham, I., Rubin, D. and Rahal, J.J.
Effect of sulbactam on infections caused by imipenem resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratu*s.
J. Infect. Dis. (1993) 167 : 448-51
- [63] . Vallee, E., Joly-Guillou, M.L. and Bergogne-Berezin, E.
Acinetobacter calcoaceticus : résistance aux beta-lactamines et beta-lactamases.
Med. Maladies Infect. (1989) 19 : 65-71
- [64] . Vallee, E., Joly-Guillou, M.L. and Bergogne-Berezin, E.
Activité comparative de l'imipénème, du céfotaxime et de la ceftazidime vis à vis d'*Acinetobacter calcoaceticus*.
Presse Med. (1990) 19 (13) : 588-91
- [65] . Vila, J., Almela, M. and De Anta Jimenez, T.
Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratu*s strains.
J. Clin. Microbiol. (1989) 27 (5) : 1086-89

- [66] . Vila, J., Marcos, A., Marco, F., Abdalla, S., Vergara, Y., Reig, R., Gomez, L.R. and De Anta Jimenez, T.
In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.
Antimicrob. Agents Chemother. (1993) 37 (1) : 138-41
- [67] . Weaver, R.E. and Actis, L.A.
Identification of *Acinetobacter* species [letter].
J. Clin. Microbiol. (1994) 32 : 1833
- [68] . Wise, K.A. and Tosolini, F.A.
Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species.
J. Hosp. Infect. (1990) 16 : 319-29
- [69] . Wood, C.A. and Reboli, A.C.
Infections caused by imipenem resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratus*.
J. Infect. Dis. (1993) 168 : 1602-03
- [70] . Ygout, J.F., Pasteau, C., Mugnier, P., Berlioux, J. and Daguet, G.L.
[Phenotypes of resistance to antibiotics of *Acinetobacter baumannii*. Impact on therapeutic orientation].
Pathol. Biol. Paris (1988) 36 (3) : 245-9
- [71] . Caillon, J., Beltan, E., Xiong, Y.Q., Lippert, E., Melchior, P., Juvin, M.E.
In vitro bactericidal activity of sulbactam alone and in combination with imipenem against *Acinetobacter baumannii* strains.
Interdisciplinary Meeting on Anti-infectious Chemotherapy, Paris, France
(1993) Abstract P10 : 176

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	6
<u>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
<i>I TAXONOMIE</i>	8
I-1) Famille et Genre	8
I-2) Espèces du Genre <i>Acinetobacter</i>.....	8
I-2-1) Historique	8
I-2-2) Classification actuellement en vigueur.....	9
<i>II CARACTERES D'IDENTIFICATION.</i>	10
II-1) Caractères cultureux.....	10
II-1-1) Les milieux usuels	10
II-1-2) Morphologie et aspect des colonies	10
II-1-3) La température de croissance	11
II-2) Caractères biochimiques.....	11
II-3) Limites de l'identification biochimique.....	13
<i>III MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES</i>	15
III-1) Marqueurs phénotypiques	15
III-1-1) Antibiotypie	15
III-1-2) Biotypie.....	16
III-1-3) Lysotypie.....	16
III-1-4) Profils électrophorétiques.....	17
III-1-5) Autres méthodes phénotypiques.....	17
III-1-6) Intérêt des méthodes phénotypiques.....	17
III-2) Marqueurs génotypiques.....	18
III-2-1) Profil plasmidique	18
III-2-2) Ribotypage	18
III-2-3) Electrophorèse en champ pulsé	19
III-2-4) Typage par amplification génique : PCR.....	19
III-2-5) Intérêt des méthodes phénotypiques.....	20
<i>IV HABITAT</i>	21
IV-1) Habitat des différentes espèces.....	21
IV-2) <i>Acinetobacter baumannii</i> chez l'homme et dans l'environnement hospitalier.....	21
IV-3) Facteurs de risque et modes de transmission.....	22

V POUVOIR PATHOGENE	24
V-1) Incidence d' <i>Acinetobacter baumannii</i> dans les infections nosocomiales.	24
V-2) Les sites de prélèvements	24
V-3) Les infections.....	25
V-3-1) Les infections respiratoires.....	25
V-3-2) Les infections urinaires.....	25
V-3-3) Les septicémies et bactériemies	26
V-3-4) Les méningites	26
V-3-5) Les suppurations diverses.....	26
V-3-6) Autres infections	26
VI SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	27
VI-1) <i>Acinetobacter baumannii</i> : une bactérie multirésistante.....	27
VI-2) Résistance aux β -lactamines.....	27
VI-2-1) Mécanismes de résistance	27
VI-2-2) Rôle des inhibiteurs de β -lactamases	31
VI-2-3) Phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	34
VI-3) Résistance aux aminosides.....	36
VI-3-1) Mécanismes de résistance	36
VI-3-2) Phénotypes de résistance aux aminosides	37
VI-4) Résistance aux quinolones.....	37
VI-5) Autres antibiotiques utilisés	37
VI-6) Association d'antibiotiques	38

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES
d'*Acinetobacter baumannii* AU BLOC DE REANIMATION
RESPIRATOIRE EN 1993

I PRESENTATION DE L'ETUDE	40
I-1) <i>Acinetobacter baumannii</i> et les autres bactéries responsables d'infections nosocomiales au bloc de réanimation respiratoire (B.R.R.).....	40
I-2) But de l'étude	44
I-2-1) Les motivations	44
I-2-2) Les objectifs	44
II MATERIEL ET METHODES	45
II-1) Matériel	45
II-1-1) Recueil des souches bactériennes.....	45

II-2) Méthodes	46
II-2-1) L'antibiogramme standard	46
II-2-2) Concentration Minimale Inhibitrice : C.M.I.	47
II-2-3) Epsilon test ou E test®.....	49
II-2-4) Fractionnal Inhibitory Concentration index	51
ou FIC index	
 III RESULTATS	 54
III-1) Antibiogramme standard, C.M.I. par dilution en milieu gélosé et C.M.I. par système epsilomètre E test®.....	54
III-1-1) Corrélations entre les méthodes utilisées	54
III-1-2) Exploitation des résultats	56
III-2) Résultats FIC index	60
 IV DISCUSSION	 61
IV-1) Antibiogramme, C.M.I. par dilution et E test®	61
IV-1-1) Critiques des méthodes utilisées	61
IV-1-2) Analyses des résultats	62
IV-2) FIC index	65
IV-2-1) Critiques de la méthode utilisée.....	65
IV-2-2) Choix des antibiotiques.....	65
IV-2-3) Commentaires des résultats.....	66
 <u>CONCLUSION</u>	 68
 <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	 70
 <u>ANNEXES</u>	 80



ANNEXES

ANNEXE 1

ANTIBIOTIQUES	Ticarcilline		Ticarcilline Ac clavulanique		Piperacilline			Piperacilline Tazobactam			
	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI	E test®	Diamètre	CMI	E test®	Diamètre	CMI	E test®
	18-22	16-64	18-22	16-64	16-64	12-20	8-64	8-64	14-21	8-64	8-64
Valeurs critiques											
N° de souches											
1:PRAD	7	256	22	128	64	15	256	256	17	64	32
2:GORN	7	256	14	256		7	256		10	256	
3	7	128	14	128	256	11	256	256	12	256	256
4	7	128	18	128		7	256		13	256	
5:GIBE	7	256	15	256	256	7	256	256	7	256	256
6	7	128	14	128		7	256		7	256	
7	8	256	17	128		7	256		7	256	
8	7	256	7	128		7	256		8	256	
9:PELL	7	256	13	256	256	14	64	256	7	256	64
10	12	128	18	128	256	7	256	256	13	256	256
11:ROUS	7	128	13	256		7	256		7	256	
12	7	256	13	256	256	7	256	256	7	256	256
13	8	128	14	256	256	7	256	256	13	256	256
14:RENA	7	256	16	128		7	256		7	256	
15	7	128	14	256		7	256		7	256	
16	7	128	16	128	256	7	256	256	11	256	256
17:VILO	12	128	17	128	256	7	256	256	10	256	256
18	7	256	12	256		7	256		10	256	
19	8	256	15	256		7	256		10	256	
20:ULMA	8	256	12	256	256	7	256	256	7	256	256
21	7	256	16	256		7	256		7	256	
22	7	128	14	128		7	64		7	256	
23	7	256	12	256	256	7	256	256	7	256	256

Les valeurs critiques des diamètres sont exprimés en mm

Les valeurs critiques des C.M.I. par la technique des dilutions et par la technique du E test® sont en mg/l

ANNEXE 2

ANTIBIOTIQUES	Ticaracilline		Ticaracilline Ac clavulanique			Piperacilline			Piperacilline Tazobactam		
	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI	E test®	Diamètre	CMI	E test®	Diamètre	CMI	E test®
Valeurs critiques	18-22	16-64	18-22	16-64	16-64	12-20	8-64	8-64	14-21	8-64	8-64
N° de souches											
24:BENE	25	16	28	8	12	24	16	16	27	0,125	0,5
25:COCQ	30	4	30	4	4	16	16	16	30	0,125	<0,023
26	28	16	29	8		18	32		22	8	
27:HERA	27	16	30	8		23	32		27	0,125	
28:HAUD	21	32	25	32	32	20	64	64	22	16	6
29	22	32	26	16		18	32		25	8	
30	7	256	12	256	256	11	256	256	14	64	256
31:HERT	25	32	28	16		16	64		24	8	
32:QUIL	25	16	29	16		19	32		26	0,125	
33:LIEV	25	16	26	8		20	16		22	0,125	
34:LANG	25	16	28	8	12	22	16	32	22	0,125	6
35:	7	128	13	256	256	7	128	256	7	256	256
36:PANA	27	8	28	8	4	22	16	12	30	0,125	0,094
37:RUFF	26	8	30	8		22	16		27	0,125	
38:REVE	15	64	26	32	24	18	64	48	18	32	16
39:VIAL	30	8	30	8	6	27	16	12	30	0,125	0,032
40	7	128	17	128		7	64		13	64	
41:AREN	12	128	16	128	256	9	256	256	15	64	256
42:JOYE	11	256	16	256		7	256		7	256	
43	8	128	17	128		7	256		12	256	

ANNEXE 3

ANTIBIOTIQUES	Sulbactam			Ceftazidime			Imipénème		
	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI	E test®	Diamètre	CMI	E test®	
Valeurs critiques	17		15-21	4-32	4-32	17-22	4-8	4-8	
N° de souches									
1:PRAD	7	16	19	16	24	30	0,25	0,25	
2:GORN	7	16	7	32		17	4	6	
3	7	8	7	32	64	25	2	2	
4	7	8	7	32		28	2		
5:GIBE	7	16	7	128	256	17	4	8	
6	7	8	7	32		22	4		
7	7	8	7	32		22	4		
8	7	8	7	256		22	4		
9:PELL	7	16	7	128	64	17	4	3	
10	7	8	8	32	96	28	2	1,5	
11:ROUS	7	16	7	128		22	4	2	
12	7	32	7	128	256	18	4	7	
13	7	32	7	32	128	24	2	2	
14:RENA	7	16	7	128		20	4		
15	7	8	7	64		20	4	4	
16	7	8	7	32	128	28	2	2	
17:VILO	7	16	12	32	48	18	2	1,5	
18	7	16	7	128		20	4		
19	7	16	7	64		22	4		
20:ULMA	7	16	7	128	256	15	4	8	
21	7	16	7	128	8	19	4	8	
22	7	8	7	32		22	4	6	
23	7	16	7	256	256	19	4	8	

ANNEXE 4

ANTIBIOTIQUES	Sulbactam			Ceftazidime			Imipénème		
	Diamètre	CMI	Diamètre	Diamètre	CMI	E test®	Diamètre	CMI	E test®
Valeurs critiques	17		15-21	4-32	4-32	4-32	17-22	4-8	4-8
N° de souches									
24:BENE	24	1	20	8	8	8	30	0,25	0,25
25:COCQ	20	1	26	4	4	4	30	0,125	0,19
26	20	1	21	8	8		30	0,125	0,25
27:HERA	23	2	25	8	8		30	0,125	
28:HAUD	20	4	16	32	48	48	30	0,5	1
29	19	4	14	32	32		30	1	
30	7	8	7	256	256	256	28	1	1,5
31:HERT	21	4	18	32	32		30	1	
32:QUIL	25	1	21	4	4		30	0,125	
33:LIEV	23	2	23	8	8		30	0,5	
34:LANG	24	2	23	8	8	12	30	0,125	0,19
35:	7	32	7	256	256	256	22	4	6
36:PANA	25	1	23	2	4	4	30	0,125	0,19
37:RUFF	24	1	23	4	4		30	0,125	
38:REVE	7	8	7	64	48	48	28	1	1,5
39:VIAL	25	1	24	4	8	8	30	0,125	0,19
40	7	16	7	256	256		29	2	
41:AREN	7	16	7	64	256	256	25	1	1,5
42:JOYE	7	32	7	256	256		22	4	
43	7	8	8	64	64		26	1	

ANNEXE 5

ANTIBIOTIQUES	Gentamicine		Nétilmicine		Tobramycine		Amikacine	
	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI
Valeurs critiques	14-16	4-8	17-19	4-8	14-16	4-8	15-17	8-16
N ° de souches								
1:PRAD	17	4	7	256	12	16	19	32
2:GORN	15	8	7	256	12	16	9	128
3	20	4	20	8	26	0,5	7	128
4	18	8	7	256	15	16	9	128
5:GIBE	18	8	7	256	12	16	7	128
6	15	8	7	256	12	16	7	128
7	16	8	7	256	12	16	8	64
8	20	4	19	16	27	2	7	128
9:PELL	15	8	7	256	12	16	7	128
10	14	8	7	256	13	16	7	128
11:ROUS	14	8	7	256	11	16	7	128
12	13	8	7	256	13	8	7	64
13	13	8	7	256	12	16	7	128
14:RENA	17	8	7	256	14	8	7	64
15	14	8	7	256	12	8	7	64
16	15	8	7	256	11	16	7	128
17:VILO	12	16	7	256	8	32	8	256
18	15	16	7	256	14	32	7	128
19	12	16	7	256	8	32	7	128
20:ULMA	20	8	17	8	26	0,25	15	32
21	15	4	7	256	12	16	11	64
22	20	2	7	128	15	4	15	32
23	15	8	7	256	14	16	9	128

ANNEXE 6

ANTIBIOTIQUES	Gentamicine		Nétilmicine		Tobramycine		Amikacine	
	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI	Diamètre	CMI
Valeurs critiques	14-16	4-8	17-19	4-8	14-16	4-8	15-17	8-16
N° de souches								
24:BENE	26	0,25	30	1	27	0,5	25	1
25:COCQ	30	0,25	30	0,25	30	0,25	30	0,5
26	30	0,125	30	0,25	30	0,25	30	0,5
27:HERA	29	0,25	30	2	27	0,25	26	1
28:HAUD	7	256	8	128	7	32	7	128
29	7	256	7	256	7	64	7	128
30	15	8	7	256	13	16	8	64
31:HERT	7	256	7	256	7	32	7	128
32:QUIL	23	1	29	2	25	1	25	1
33:LIEV	26	1	30	2	25	0,5	26	1
34:LANG	28	0,5	30	2	29	0,5	30	1
35	16	8	7	256	12	16	7	64
36:PANA	24	0,25	30	1	26	0,5	25	1
37:RUFF	26	0,5	30	2	27	0,5	27	1
38:REVE	7	256	12	128	7	256	7	256
39:VIAL	30	0,5	30	2	30	1	30	2
40	16	16	7	256	13	16	7	64
41:AREN	13	16	7	256	10	16	11	128
42:JOYE	14	8	7	256	11	16	22	4
43	12	8	7	256	8	16	7	128



RESUME

Acinetobacter baumannii est l'espèce principale du genre *Acinetobacter* responsable d'infections nosocomiales.

Des tests biochimiques permettent l'identification des espèces génomiques du genre définies, en 1986, par la technique d'hybridation ADN-ADN. Cependant cette identification n'est pas parfaite car elle ne permet pas de distinguer sans ambiguïté les différentes espèces. Devant l'importance d'*Acinetobacter baumannii* à l'hôpital, les études épidémiologiques menées ont nécessité le développement de techniques discriminantes pour typer les souches.

Acinetobacter baumannii est une bactérie ubiquitaire. En milieu hospitalier, le personnel soignant et l'environnement constituent les sources de contamination. Pathogène opportuniste, cette espèce provoque des infections chez les sujets des services de soins intensifs et de réanimation respiratoire qui ont pu être préalablement colonisés.

La multirésistance aux antibiotiques est apparue durant ces dernières années car *Acinetobacter baumannii* a développé de nombreux mécanismes de résistance vis à vis des β -lactamines, aminosides et fluoroquinolones. La résistance aux β -lactamines est due à la production de pénicillinase et ou de céphalosporinase. L'imipénème reste le plus actif sur les souches multirésistantes, toutefois des mécanismes de résistance ont été décrits (altération des PLP, modification de la perméabilité membranaire). La résistance aux aminosides est due à la présence d'enzymes modifiant la structure des aminosides.

L'apparition, en 1993, au bloc de réanimation respiratoire de Toulouse Rangueil de souches d'*Acinetobacter baumannii* intermédiaires à l'imipénème a motivé notre étude. A l'aide de deux techniques de détermination des concentrations minimales inhibitrices (par dilution et par la méthode E test®) nous avons voulu préciser l'activité des antibiotiques (β -lactamines, sulbactam et aminosides) sur ces souches. Nous avons également testé l'effet bactériostatique de l'association d'antibiotiques (imipénème-gentamicine et imipénème-sulbactam) en calculant le FIC index par une technique dérivée de la méthode de l'échiquier.

Notre étude nous a permis de confirmer la multirésistance de cette bactérie. Les souches à sensibilité diminuée à l'imipénème sont résistantes aux autres antibiotiques y compris au sulbactam. *In vitro* nos résultats ont montré que les associations étaient synergiques en bactériostase. Toutefois, comme dans toutes les études d'association d'antibiotiques, l'efficacité *in vivo* n'est pas transférable.

MOTS-CLES

Acinetobacter baumannii
Infections nosocomiales
Résistance
Antibiotiques

COREP

125, route de Narbonne
31400 TOULOUSE
Tél. 61 55 54 25 - Fax 62 17 08 43

