

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE PARIS 6**

ECOLE DOCTORALE : COMPLEXITE DU VIVANT (515)

Spécialité: **MICROBIOLOGIE**

Présentée par

Najiby KASSIS-CHIKHANI

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Titre de la thèse :

***KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
PATHOGENE NOSOCOMIAL
RESISTANCE ET VIRULENCE**

Soutenue le 21 mars 2012

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Vincent JARLIER	Président
Monsieur le Professeur Antoine ANDREMONT	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-Louis GAILLARD	Rapporteur
Monsieur le Docteur Jean-Ralph ZAHAR	Examineur
Monsieur le Professeur Guillaume ARLET	Directeur
Madame le Docteur Dominique DECRE	Co-directeur

REMERCIEMENTS

A Mr le Professeur Jarlier

qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Il a toujours été d'un grand soutien à différentes périodes, parfois difficiles, de ma vie professionnelle et je lui en suis extrêmement reconnaissante.

A Mr le Professeur Andremont

qui a accepté de consacrer du temps à l'évaluation de mon manuscrit, qui m'a accueillie pendant 4 ans comme Assistante-Hospitalo-Universitaire dans son laboratoire à l'hôpital Bichat et m'a ouvert les voies de la Bactériologie et de l'Hygiène.

A Mr le Professeur Gaillard

qui pour la deuxième fois a accepté d'être mon rapporteur... (la première fois pour mon poste de PH à l'hôpital Paul Brousse) et a accepté de consacrer du temps à l'évaluation de mon manuscrit.

A Mr le Docteur Zahar

qui a accepté d'examiner ce travail, je lui en suis très reconnaissante.

A Mr le Professeur Arlet

qui a dirigé ce travail. Il m'a incitée à entreprendre ce travail et toujours encouragée. Je le remercie pour sa passion, son enthousiasme, sa culture scientifique qu'il sait si bien transmettre à toute l'équipe. C'est pour moi un grand plaisir de travailler avec lui.

A Mme le Docteur Decré

qui a dirigé ce travail avec compétence et rigueur. Je la remercie pour son soutien, sa disponibilité et surtout son amitié qui m'est si précieuse.

A Mme le Professeur Dussaix

ma « Chief », qui m'a accueillie dans son laboratoire de Microbiologie à l'hôpital Paul Brousse. Je la remercie pour sa confiance, son soutien, ses encouragements, son affection.

A mon équipe

Cathy Boutelier, Christiane Guérin, Christian Sengelin, Céline Petetin pour leur soutien, leur aide, leur collaboration.

A toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Paul Brousse

pour leur aide et leur collaboration.

A tous les personnels du CHB

qui sont des collaborateurs exceptionnels.

A toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Saint-Antoine

en particulier Béatrice, Delphine et Nathalie, pour leur accueil chaleureux et leur aide précieuse.

A mes parents

pour leur soutien pendant ces longues années

A Michel et Charles

pour leur présence à mes côtés, leurs encouragements et leur patience ...

RESUME

Dans la première partie du travail, suite à deux épidémies à *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases, nous avons défini une stratégie précise qui nous a permis de maîtriser et de stopper la première épidémie et de très rapidement contrôler la seconde. Des mesures similaires ont été appliquées avec succès dans d'autres hôpitaux en France, en Israël et aux USA.

Ces deux épidémies étant liées à la diffusion de clone épidémique, nous avons étudié la prévalence des facteurs de virulence parmi une collection internationale de souches de *K. pneumoniae* multirésistantes aux antibiotiques. Nous avons pu établir un lien entre résistance et virulence avec, en particulier une forte prévalence (42%) d'un îlot de pathogénicité portant la yersiniabactine, Ybts, qui joue essentiel dans l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia* sp.

Dans la deuxième partie, nous montrons que les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE de type CTX-M-15, sont associées à des plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité IncF alors que les plasmides portant les gènes *bla_{SHV}* et ceux portant les carbapénémases, sont moins bien caractérisés et souvent non typables par la méthode de PCR. Ces résultats incitent au séquençage des plasmides.

Nous avons procédé au séquençage et à l'annotation du premier plasmide portant à la fois KPC-2 et SHV-12 isolé d'une souche de *K. pneumoniae*. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence un nouveau groupe d'incompatibilité (IncX) impliqué pour la première fois dans la multirésistance chez *K. pneumoniae*. Nous avons pu montrer l'insertion du transposon Tn4401 (KPC) au sein du transposon portant la BLSE de type SHV-12.

Mots clés: *Klesiella pneumoniae*, épidémie, mesures de contrôle, îlot de pathogénicité, réplicon, plasmide, séquençage.

**Laboratoire de Bactériologie
Faculté de Médecine Saint-Antoine
Université Paris 6 Pierre et Marie Curie**

TITTLE :
KLEBSIELLA PNEUMONIAE
NOSOCOMIAL PATHOGEN
RESISTANCE AND VIRULENCE

ABSTRACT

In the first part of our work, following two outbreaks that involved *K. pneumoniae* producing carbapenemases, we defined a clear strategy that allowed us to control and stop the spread of those strains. Similar measures have been applied successfully in other hospitals in France, Israel and the United States. These two outbreaks, linked to the spread of epidemic clones, led us to study the prevalence of virulence factors among an international collection of multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains. We could establish a link between resistance and virulence with, especially a high prevalence (42%) of a pathogenicity island bearing the yersiniabactin, Ybts, which plays an essential role in the expression of hyper-virulent phenotype of *Yersinia* sp.

In the second part of our work, we showed that strains of *K. pneumoniae* producing CTX-M-15 type ESBL, are associated with plasmids belonging to incompatibility group IncF whereas plasmids carrying *bla*_{SHV} genes and carbapenemases, are less well characterized by the PCR method. These results lead to the sequencing of plasmids.

We report the complete nucleotide sequence of the first IncX plasmid carrying a *bla*_{KPC-2} gene from *Klebsiella*. It consists of the backbone of the IncX plasmid and carries a region encoding both KPC-2 and SHV-12. The transposon Tn4401 is inserted in a part encoding the *bla*_{SHV-12}.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, outbreaks, control measures, replicon, plasmid, plasmid sequence, pathogenicity island.

Laboratoire de Bactériologie
Faculté de Médecine Saint-Antoine
Université Paris 6 Pierre et Marie Curie

RESUME ET PERSPECTIVES

Dans la première partie de notre travail, à la suite de deux épidémies à *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases, nous avons défini une stratégie précise qui repose sur le repérage des patients à risque, la mise en place et le maintien des précautions contacts, l'isolement géographique, le dépistage, et l'organisation des soins, la formation du personnel et enfin, en présence d'un cas secondaire, la mise en place du cohorting et du personnel dédié. Ces mesures nous ont permis de maîtriser et de stopper la première épidémie et de très rapidement contrôler la seconde. Des mesures similaires ont été appliquées avec succès dans d'autres hôpitaux en France et également en particulier en Israël et aux USA.

Ces deux épidémies étant liées à la diffusion de clone épidémique, nous avons voulu étudier la prévalence des facteurs de virulence (ou de survie aux stress) parmi une collection internationale de souches de *K. pneumoniae* productrices de β -lactamases conférant la résistance aux céphalosporines et parfois aux carbapénèmes et, dont certaines ont été responsable d'épidémies. Ce travail est le premier à établir un lien entre résistance et virulence avec, en particulier une forte prévalence (42%) d'un îlot de pathogénicité portant la yersiniabactine, Ybts, qui joue essentiel dans l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia* sp.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous montrons que les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE de type CTX-M-15, sont associées à des plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité IncF, plasmides qui résident chez *K. pneumoniae* et qui de plus portent un, voire deux systèmes de maintien ou systèmes d'addiction de type toxine-antitoxine. En revanche, les plasmides portant les gènes *bla*_{SHV} et ceux portant les carbapénémases, sont moins bien caractérisés et souvent non typables par la méthode de PCR. Ces résultats incitent à l'analyse plus complète des plasmides, en particulier grâce au séquençage.

Nous avons séquencé le premier plasmide portant à la fois KPC-2 et SHV-12 isolé d'une souche de *K. pneumoniae* responsable d'une épidémie dans notre hôpital. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence un nouveau groupe d'incompatibilité (IncX) impliqué pour la première fois dans la multirésistance chez *K. pneumoniae*. Nous avons pu également montrer l'insertion du transposon KPC (*Tn4401*) au sein du transposon portant la BLSE de type SHV-12. Ce travail confirme donc les capacités importantes de transposition du transposon KPC.

Les perspectives de ce travail sont (i) le séquençage de la région comprenant l'HPI et le système de sécrétion de type IV et la recherche d'un éventuel système de mobilisation dans nos 30 souches multirésistantes possédant à la fois l'HPI et le gène *virB1* (ii) l'étude de la virulence de ces souches dans un modèle animal d'infection avec des souches avec et sans yersiniabactine afin de préciser le rôle de la yersiniabactine dans l'infection à *K. pneumoniae*.

A moyen terme, il nous paraît indispensable de mieux caractériser les souches responsables d'épidémie, de déterminer leurs caractères de virulence, de séquencer les plasmides et les génomes. Il faudra évidemment, évaluer ces gènes candidats par des études *in vitro* et chez l'animal, ce qui nous invitera à développer encore d'autres collaborations.

TABLE DES MATIERES	8
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE	9
I-L'espèce <i>K.pneumoniae</i>	9
1-Généralités	9
2- Habitat et pouvoir pathogène	9
3- <i>K. pneumoniae</i> et épidémies hospitalières	11
4- Méthodes de typage	12
II-Facteurs de virulence de <i>K. pneumoniae</i>	13
1- Antigènes de surface	13
2- Adhésines	17
3- Sidérophores	19
4- Îlot de pathogénicité	23
5- Integrative and Conjugative Element (ICE)	25
6- Autres gènes de virulence	31
III- Résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux antibiotiques	32
1- Sensibilité naturelle de <i>K. pneumoniae</i>	32
2- Résistances acquises de <i>K. pneumoniae</i>	33
IV- Rappel sur les mécanismes d'action et de résistance aux β-lactamines	34
1- Généralités	34
2- Résistance aux β -lactamines	34
3- Classification et évolution des β -lactamases	37
a. Classification des β -lactamases	37
b. Les β -lactamases à spectre étendu	40
c. Les céphalosporinases acquises	46
d. Les carbapénèmases	47
e. Multirésistance des souches de <i>K. pneumoniae</i>	53
V- Supports génétiques de la résistance	54
1- Place des plasmides	55
a. Généralités	55
b. Plasmide: réplication et contrôle	56
c. Plasmide: nombre de copies, incompatibilité, classification	56
d. Plasmide: fonctions de maintien	57
e. Plasmide : mobilité	59
2- Les séquences d'insertion	61
3- Les éléments transposables	62
4- Les intégrons	63

VI- Les éléments génétiques associés aux BLSE et carbapénémases, en particuliers chez <i>K. pneumoniae</i>	65
VII- Réplicons et plasmides séquencés de <i>K. pneumoniae</i>	71
TRAVAIL PERSONNEL	75
Objectifs du travail	76
Publication n°1: Extended measures for controlling an outbreak of VIM-1 producing imipenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> in a liver transplant centre in France, 2003-2004.	79
Publication n°2: Outbreak of <i>Klebsiella pneumoniae</i> producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital.	95
Publication n°3: (en cours de rédaction): Occurrence of virulence factors, high pathogenicity island and ICE $kp1$ in clinical isolates of multi-drug <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	105
Publication n°4: (soumise) Replicons and their addiction systems in <i>Klebsiella pneumoniae</i> susceptible or resistant to broad-spectrum cephalosporins and/or carbapenems.	114
Publication n°5: (en cours de rédaction): Complete nucleotide sequence of KPC-2 and SHV-12 encoding plasmid pKpS90 from <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	144
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
ANNEXES	190

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

I- L'espèce *Klebsiella pneumoniae*

1- Généralités

D'un point de vue taxonomique, le genre actuel *Klebsiella* comprend 2 espèces principales: *K. pneumoniae* (subdivisée en 3 sous-espèces) et *K. oxytoca*. Les anciennes espèces taxonomiques *K. rhinoscleromatis* et *K. ozenae* sont des sous-espèces de *K. pneumoniae* et l'analyse MLST montrent qu'elles représentent des clones au sein de l'espèce *K. pneumoniae* (30). Enfin, s'ajoutent *K. granulomatis*, agent de la donovanose, ainsi que 2 taxons récemment individualisés (*K. variicola* et *K. singaporensis*) (12).

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie appartenant au genre *Klebsiella*. Il s'agit d'un bacille à Gram négatif toujours immobile et très souvent capsulé poussant sur milieu ordinaire en atmosphère aéro-anaérobie, oxydase négative, fermentant le glucose et le lactose en produisant du gaz, produisant de l'indole et une uréase et fermentant l'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer), réduisant les nitrates en nitrites.

2- Habitat et pouvoir pathogène

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire. Elle peut être isolée de l'environnement (sols, eaux de surface, eaux usées, végétaux) ainsi que des flores commensales de l'homme et des animaux (12). Elle colonise jusqu'à 30% des individus au niveau des muqueuses digestive et nasopharyngée. La colonisation augmente de façon très importante chez les patients hospitalisés (66, 123).

K. pneumoniae est à l'origine d'infections communautaires ; elle a été initialement décrite dans des pneumonies nécrosantes (pneumo-bacille de Friedlander) survenant essentiellement sur terrain éthylique (46). Elle est aujourd'hui surtout reconnue comme responsable d'infections nosocomiales (infections urinaires, intra-abdominales, infections de site

opératoire, septicémies, pneumonies). En Europe comme aux Etats Unis, environ 8% des infections nosocomiales sont dues à cette espèce. En France, le rapport de l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques) de 2008 indique que *K. pneumoniae* est responsable respectivement de 4,8% et 4,5% des bactériémies communautaires et nosocomiales, ce qui la place au 3^{ème} rang des bacilles à Gram négatif après *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. *K. pneumoniae* occupe une place importante dans la pathologie infectieuse du nouveau-né. En effet, les infections nosocomiales à *K. pneumoniae* dans les services de néonatalogie sont fréquentes, notamment dans les unités de soins intensifs et chez les prématurés (17, 113).

Le contrôle des infections nosocomiales à *K. pneumoniae* repose d'une part sur la maîtrise de leur transmission (respect de mesures d'hygiène classiques, lavage des mains, isolement géographique et technique des patients porteurs, respect des protocoles de soins des cathéters urinaires et veineux, des trachéotomies, des plaies et de l'équipement hospitalier) (31) et d'autre part, sur la maîtrise de la prescription des antibiotiques. Mais ce contrôle ne peut être efficace sans une connaissance approfondie des capacités de virulence et de transmissibilité des différents isolats à l'intérieur de l'espèce *K. pneumoniae*.

Enfin, depuis les années 80, *K. pneumoniae* a émergé comme agent d'abcès hépatiques primitifs survenant dans la communauté chez des patients sans antécédents de pathologie hépatobiliaire (197). Ce syndrome, associé à une bactériémie et éventuellement des complications métastatiques (endophtalmie, méningite ...), a été essentiellement décrit en Asie (55, 96, 271). Plus récemment, des cas ont été rapportés en Amérique du Nord et en Europe (100, 256, 81), souvent chez patients d'origine asiatique, suggérant une susceptibilité génétique à cette infection. Dans la majorité des cas, les souches à l'origine de ce syndrome appartiennent au sérotype capsulaire K1 et au complexe clonal ST23 (256). D'autres sérotypes (K2, K54 et K57) sont plus rarement rencontrés

dans ce syndrome. Des souches de sérotype K2, appartenant à des ST émergents (ST86, ST380) ont également été rapportées dans des infections sévères (81). En Europe et en Amérique du nord, le sérotype K2 apparaît assez fréquemment (5 à 20 %) parmi les infections nosocomiales. En revanche le sérotype K1 n'y est pas observé en dehors des abcès du foie. (287, 256)

3- *K. pneumoniae* et épidémies hospitalières

K. pneumoniae est la principale espèce bactérienne responsable d'épidémies intra-hospitalières. Depuis janvier 2006, date de notre première publication sur ce sujet (139), nous avons analysé 85 publications descriptives référencées dans PubMed en tapant les mots clés « *klebsiella pneumoniae* and nosocomial outbreak(s) ». Toutes ces publications relatent des épidémies dues à des souches multirésistantes et productrices des nouvelles β -lactamases. Les pays concernés sont répartis sur les 5 continents avec une faible représentation des pays en voie de développement, en raison de l'insuffisance des moyens humains, techniques et biologiques pour publier dans des revues internationales.

Les pays le plus concernés par ces problèmes sont : les Etats Unis (n=11 publications), la Grèce (n=10), Espagne (n=9), Amérique du sud (n=9) Italie et la France (n=7), Israël (n=4), corée (n=3), Chine (n=2). Le nombre de cas rapportés par épidémie varie de 2 à 161. Dans 25% des cas les services concernés sont des unités de soins intensifs adultes ou de néonatalogie.

Les principales β -lactamases associées à ces clones épidémiques sont essentiellement des carbapénémases (n=50) (KPC, VIM, OXA-48), des β -lactamases à spectre étendu (n=36) (CTX-M-15, SHV-12), des AmpC (n=5) (DHA). Certains clones définis par *Multilocus sequence Typing* (MLST) ont été rapportés associés à certaines β -lactamases, en particulier, ST258 (Sequence Type) et KPC-3, complexe clonal (CC) ST11, ST15, ST47 et CTX-M-15, ST101, ST395 et OXA-48

Quatre enquêtes nationales ont rapporté la diffusion de clones épidémiques (i) en Hongrie avec un clone produisant CTX-M-15 (196 cas dans 41 hôpitaux), (ii) en Grèce avec un clone produisant VIM-1 (40 hôpitaux, 20% des isolats de *K. pneumoniae*), (iii) en Grèce avec un clone produisant KPC-2 (166 cas dans 44 hôpitaux), (iv) en Israël avec un clone produisant KPC-3 (1275 cas dans 27 hôpitaux).

4- Méthodes de typage

Du point de vue épidémiologique, différentes méthodes ont été proposées pour comparer les souches de *K. pneumoniae*. Parmi les méthodes phénotypiques, le sérotypage, basé sur la détermination de l'antigène capsulaire K, est difficilement applicable : 77 sérotypes capsulaires sont actuellement reconnus. Une méthode par PCR-RFLP a été décrite (29).

Parmi les méthodes moléculaires, le ribotypage est très discriminant pour les isolats de *K. pneumoniae*. L'électrophorèse en champ pulsé est une technique de référence, reproductible et discriminante mais relativement longue. Les techniques d'amplification aléatoire (RAPD, ERIC-PCR) sont faciles à mettre en œuvre mais moins discriminantes ; elles peuvent être néanmoins adaptées à l'épidémiologie locale (79).

Enfin, le MLST qui consiste à amplifier et séquencer plusieurs gènes de ménage, est reproductible et permet de comparer des souches entre laboratoires. Le schéma MLST, développé par Diacourt *et al.*, basé sur 7 gènes, est actuellement le plus utilisé (85). Il a permis, notamment de mettre en évidence la diffusion du clone ST23 dans les abcès hépatiques émergents. Le travail récent de Brisse *et al.* a montré l'existence de complexes clonaux associés à un pouvoir pathogène particulier, par exemple CC23^{K1} et CC82^{K2} (30). Par ailleurs, le typage MLST est largement utilisé dans les études de clonalité des souches multi-résistantes disséminant à l'échelle mondiale. Ainsi, certains clones producteurs de CTX-M-15 comme les clones ST11 et ST15 semblent avoir un haut potentiel épidémique. Il en est de même pour le clone ST258

producteur de carbapénémase de type KPC (233) qui est un variant sur un seul locus du clone ST11 (77).

II- Facteurs de virulence de *K. pneumoniae*

Les termes facteur de pathogénicité et facteur de virulence sont souvent utilisés comme synonymes. Mais certains auteurs font une distinction claire entre les deux : le terme pathogénicité définit la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que la virulence est la mesure ou le degré de pathogénicité (207).

Cinq types de facteurs ont fait l'objet d'études (figure 1).

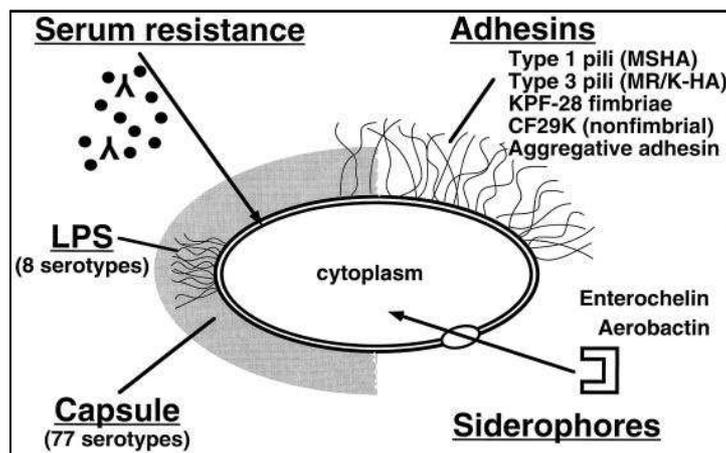


Figure 1 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae*. D'après Podschun *et al.* (207).

1- Antigènes de surface

Deux types d'antigènes sont exprimés à la surface de *K. pneumoniae*. Ces deux antigènes contribuent à la pathogénie de cette bactérie. Le premier est l'antigène O qui est composant du liposaccharide (LPS) et dont 9 types ont été identifiés. Le second est l'antigène capsulaire (K), un polysaccharide capsulaire dont 82 ont été décrits et 78 caractérisés.

- Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, est formé de plusieurs composés : le lipide A de structure oligosaccharidique, et l'antigène O. L'antigène O, composé le plus externe

du LPS, est formé d'unités répétées de polymères d'oligosaccharides. Il existe une grande variabilité chimique de la composition de l'antigène O, reflet de la variabilité génétique des gènes impliqués dans la synthèse de l'antigène O et situés au niveau du cluster *wb*. Le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique.

- La capsule

La majorité des souches de *K. pneumoniae* produit une capsule de nature polysaccharidique ; elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique (68).

Sur les 82 antigènes capsulaires, 77 constituent une base de reconnaissance internationale. La capsule est essentielle à la virulence des klebsielles (68, 88, 126). Elle forme d'épais faisceaux de structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne en couche épaisse et dense (3) qui protège la bactérie de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles, d'une part (205, 206, 242, 243), et de l'effet bactéricide de facteurs sériques d'autre part (274). Le mécanisme moléculaire consisterait à inhiber l'activation ou l'absorption des composants du complément, en particulier C3b (275). Outre leur fonction antiphagocytaire, les polysaccharides capsulaires pourraient inhiber la différenciation et les capacités fonctionnelles des macrophages *in vitro* (284, 285). Toutefois, en termes de pathogénicité, il existe des différences importantes en fonction des sérotypes capsulaires. Plusieurs modèles d'infections expérimentales ont permis de mettre en évidence ces différences. Les souches exprimant les antigènes capsulaires K1 et K2 sont particulièrement virulentes dans un modèle murin de péritonite comparées à d'autres sérotypes qui sont peu ou pas virulents (94, 171). Dans les lésions cutanées induites expérimentalement chez la souris, les souches de sérotypes K1, K2, K4, K5 se sont révélés les plus virulentes (241). En pathologie humaine, même si les données sont parcellaires, les souches de sérotype K1 et K2 sont actuellement, considérés comme les

plus virulentes. Le degré de virulence de la capsule semble corrélé avec son contenu en mannose. En effet, les sérotypes capsulaires tels que K7 ou K21 (190, 206) contiennent des séquences répétées de mannose- α -2/3mannose ou L-rhamnose- α -L-rhamnose. Ces séquences sont reconnues par une lectine de surface des macrophages qui entraîne une phagocytose sans opsonisation (par le complément ou des anticorps), connu sous le nom de lectinophagocytose (9). En revanche, les sérotypes ne possédant pas ces séquences répétées ne sont pas reconnus par les macrophages et donc non phagocytés. Ce modèle est cohérent avec la forte virulence des souches K2 qui n'ont pas de mannose- α -2/3 - 2/3mannose (135, 190). Bien qu'il n'existe pas de corrélation entre sérotypes et sites d'infection, plusieurs études suggèrent l'implication du sérotype K2 dans les infections urinaires, pulmonaires ou les bactériémies. De plus, le sérotype K2 est retrouvé essentiellement dans les souches humaines et très rarement dans l'environnement (31, 93, 170, 204).

Les souches de sérotype K1 ont été depuis les années 80 associées au syndrome clinique associant un abcès primitif du foie et des complications métastatiques (endophtalmie, méningite) largement décrit en Asie (197, 96). Les souches isolées de ces infections sont le plus souvent hypermuqueuses et 2 gènes impliqués dans la synthèse de la capsule ont été proposés comme facteurs de virulence. Le premier gène, *magA* (*mucoviscosity-associated gene A*), est présent chez 98% des souches isolées d'abcès hépatiques. Il s'agit d'un gène chromosomique (WZY_{KpK1}) localisé dans l'opéron capsulaire (*cps*) et spécifique du sérotype K1 (96, 248, 59, 30). Sa présence est corrélée avec le phénotype hypermuqueux, la résistance à la phagocytose et au sérum et à une plus grande virulence chez la souris (96). Ce phénotype hypermuqueux peut-être mis en évidence par le string test (figure 2).

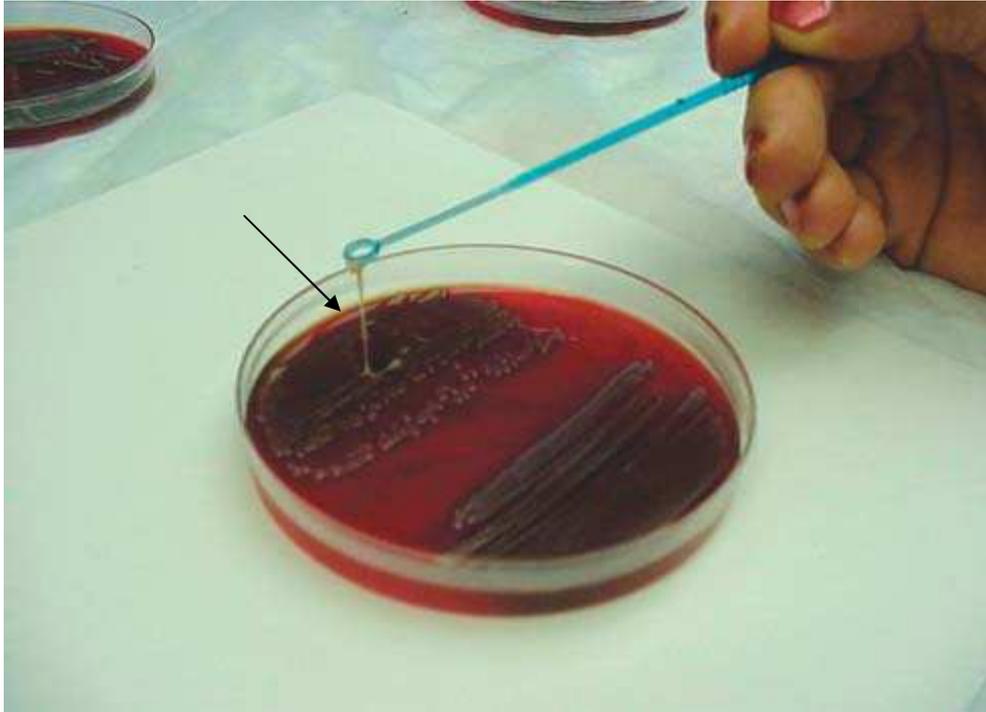


Figure 2: String test : L'étirement d'une colonie de *K. pneumoniae* provoque la formation d'un fil de plus de 5mm de longueur en faveur du phénotype hypermuqueux. D'après Yu *et al.* (287).

Le second gène associé aux infections invasives, *rmpA* (*regulator of the mucoid phenotype*) a été décrit en 1989 par Nassif *et al.* (181). Il s'agit d'un gène plasmidique connu comme un activateur transcriptionnel de la synthèse du polysaccharide extracapsulaire, différent de la capsule et, participant au caractère hypermuqueux des isolats. Le phénotype hypermuqueux résulte de la surproduction du polysaccharide extracapsulaire qui est codée par le chromosome et régulée positivement par le gène *rmpA* situé sur un plasmide. Yu *et al.* (288) montrent, dans une collection de souches de *K. pneumoniae* issues d'infections, qu'il y aurait une corrélation entre phénotype hypermuqueux et présence du gène *rmpA* et que la coexistence des gènes *magA* (*mucoviscosity associated gene A*) et *rmpA* potentialiserait l'expression du phénotype hypermuqueux. Une étude récente, (160) indique que le phénotype hypermuqueux est fortement corrélé avec la présence du gène *rmpA* dans les infections urinaires à *K. pneumoniae* chez les patients non

immunodéprimés. Plusieurs études ont établi des corrélations entre sérotype et présence des gènes *magA* et *rmpA* : les résultats suggèrent que le sérotype K1 ou K2, sont des déterminants de virulence plus importants que les gènes *magA* et *rmpA* (288). De plus, l'analyse de Brisse *et al.* (30) indique que les souches de sérotype K1 responsables d'abcès hépatiques n'appartiennent pas aux mêmes complexes clonaux (CCs) que celles isolées d'infections respiratoires et de bactériémies. Il en est de même pour les souches de sérotype capsulaire K2 qui sont distribuées parmi plusieurs CCs. Ces observations témoignent des transferts horizontaux au sein de l'opéron *cps* responsable de la synthèse du polysaccharide capsulaire. En conséquence, la détermination du CC, basée sur la détermination des sequence types (ST) (un complexe clonal peut regrouper plusieurs ST), est mieux corrélée la virulence des souches que le sérotype.

2- Adhésines

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Le terme d'adhésine est utilisé pour la dénomination de molécules variées impliquées dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des *Enterobacteriaceae* sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Ce sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Bien que les 2 termes pili et fimbriae soient habituellement considérés comme synonymes, ils devraient être différenciés : fimbriae pour l'adhésion aux cellules et pili pour les appendices formés lors de la conjugaison.

Ils sont formés de différentes sous-unités. Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3.

- Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries (figure 3). Ils ont la plus grande capacité

d'adhésion. Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire. Leur rôle a clairement été démontré pour *Escherichia coli* au cours des infections urinaires. Leur rôle pour *K. pneumoniae* a été également décrit dans un modèle murin (249). Ces fimbriae sont caractérisés par leur aptitude à lier les résidus mannoses. La sous-unité responsable de la spécificité de liaison aux sucres est **FimH** (234). L'inactivation du gène correspondant abolit la capacité d'adhésion de la bactérie. Chez *E. coli* comme chez *K. pneumoniae*, l'expression des fimbriae de type 1 est soumise à un phénomène de variation de phase (transcription ou non du gène codant la protéine d'adhésion selon la phase). En effet, ces adhésines peuvent dans certaines situations avoir un effet délétère pour la bactérie puisqu'elles favorisent la phagocytose. Ainsi, leur synthèse est favorisée dans l'arbre urinaire et réprimée dans les tissus riches en cellules phagocytaires.

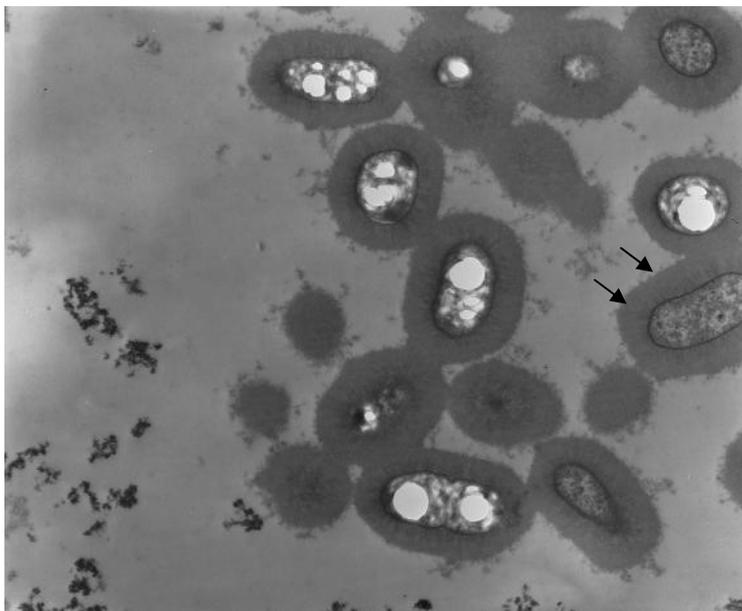


Figure 3: Structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne. D'après Podschun *et al.* (207).

- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins bien connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Leur

activité nécessite un polypeptide, **MrkD** (238), qui facilite la liaison à la membrane basale des tissus humains mais leur récepteur cellulaire n'a pas été identifié. Leur rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections (urinaire, pulmonaire). Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde.

3- Sidérophores

Un autre facteur de virulence important est la possibilité qu'ont les bactéries de capter le fer environnant grâce à des structures particulières, les sidérophores. En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection. Dans l'organisme de l'hôte, le fer n'est pas à l'état libre mais associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. Dans ces conditions, les bactéries ont besoin d'un système ayant une forte affinité pour le fer capable d'entrer en compétition avec ces glycoprotéines. Le principal système est celui des sidérophores, qui sont des chélateurs de bas poids moléculaire se liant au fer sous la forme Fe^{3+} en dehors de la cellule et, qui sont ensuite captés par des récepteurs de la membrane cellulaire d'où le fer sera libéré dans la cellule par divers mécanismes. Ces sidérophores captent le fer avec une affinité jusqu'à 10 fois supérieure à celle du fer pour la transferrine ou à la lactoferrine.

Il en existe 3 types : les entérobactines, les aérobactines et les yersinabactines. Les entérobactines sont des sidérophores de type catecholate, les aérobactines des sidérophores de type hydroxamate et, les yersinabactines des sidérophores de type phenolate (150).

Pour se défendre contre l'infection, les mammifères ont développé un certain nombre de mécanismes exploitant le besoin en fer des bactéries. Une des stratégies pour limiter la croissance bactérienne est d'augmenter

l'expression des récepteurs de la lactoferrine et de la ferritine qui entraînent une diminution de la concentration sérique du fer (134). Une stratégie plus spécifique implique la lipocaline 2 (Lcn2, ou *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, ou sidéocaline, ou uterocaline). Cette protéine bactériostatique est présente dans les granules des polynucléaires neutrophiles, et peut être sécrétée en réponse à une activation de récepteur Toll-like 4 (TLR4). Lcn2 va se lier à des complexes sidérophore-fer dont l'entérobactine produite par les entérobactéries. Lcn2 exerce son activité bactériostatique en séquestrant le fer complexé à l'entérobactine privant ainsi la bactérie de fer. Pour déjouer ce dispositif, les entérobactéries sont capables de fabriquer des formes alternatives d'entérobactines (salmochélines, entérobactine glycosylée, décrites chez *Salmonella enterica*). La synthèse de ces protéines est sous le contrôle d'un cluster de gènes, *iroA* retrouvé également chez *E.coli* et *K.pneumoniae* (14). Le cluster *iroA* code pour 5 protéines impliquées dans le transport et la modification de l'entérobactine : IroB, IroE, IroD, IroC et IroN. Fischbach *et al.* ont montré que le cluster de gènes *iroA*, dans des souches pathogènes de *E.coli*, de *Salmonella* ou de *K.pneumoniae* favorise leur virulence par l'échappement à l'action de la protéine Lcn2 (99).

Bachman *et al.* (11) ont étudié 129 souches de *K. pneumoniae* responsables d'infections de divers sites. Le sidérophore de l'entérobactine était retrouvé dans 100% des souches. En revanche la yersiniabactine n'était présente que chez 17% des souches (22/129) et essentiellement dans celles responsables d'infections respiratoires (11/33) ; l'aérobactine était rarement retrouvée (3/129). Ils ont montré que (i) les souches possédant la yersiniabactine sont associées à un risque élevé d'infection pulmonaire, (ii) la yersiniabactine permet aux souches de *K. pneumoniae* d'échapper à l'action de la Lcn2 dans le poumon causant alors une pneumonie, (iii) la yersiniabactine a une fonction spécialisée car elle stimule la croissance de *K. pneumoniae* dans le poumon mais pas dans le serum, (iv) les souches exprimant l'entérobactine sont responsables

d'infections pulmonaires opportunistes pouvant être sévères en l'absence de Lcn2. Les souches possédant des sidérophores résistants à la Lcn2 sont souvent associées aux infections communautaires, en particulier les abcès hépatiques rapportés en Asie. Ils sont dus à des souches de *K. pneumoniae* exprimant de multiples sidérophores résistants à Lcn2 dont la yersiniabactine et l'entérobactine glycosylée (144).

- **Les entérobactines** (ou entérocholines) sont les sidérophores les plus souvent rencontrés ; ils sont présents chez la plupart des souches de *K. pneumoniae*. Le locus de ce sidérophore comprend de nombreux gènes, dont **entB**.
- **L'aérobactine** est produite par une faible proportion de souches et a une plus faible affinité pour le fer que l'entérobactine. Le gène la codant est porté par un plasmide conjugatif. Il a été montré que la production d'aérobactine était associée à une augmentation significative de la virulence de *K. pneumoniae* dans un modèle murin de péritonite (28, 180).
- **La yersiniabactine** a été décrite en 1993 par Haag et al (117). L'acquisition de sidérophores tels que la yersiniabactine par certaines bactéries formant des îlots d'hyperpathogénicité, HPI, (*High-Pathogenicity Islands*), semblent avoir été une étape primordiale dans l'évolution des pathogènes.

Le locus de la **yersiniabactine**, décrit chez *Yersinia pestis* et *Y. enterocolitica* par E. Carniel en 2001 (45), est situé sur un îlot (43, 44) porteur des clusters de gènes impliqués dans la synthèse, le transport et la régulation de la yersiniabactine. Ce locus est formé de 11 gènes organisés en 4 opérons (figure 4), (tableau 1). La fonction exacte de tous ces gènes n'est pas totalement élucidée mais ils peuvent être divisés en 3 groupes fonctionnels :

- Synthèse de la yersiniabactine : *irp1*, *irp2* (*iron regulatory protein*) (16) qui codent respectivement les protéines HMWP1 et P2 (*high-molecular-weight protein*), *ybtT*, *ybtE* et *ybtS* qui codent des thioesterases ;
- Transport de la yersiniabactine et du fer dans les bactéries (recepteurs extramembranaires et transporteurs) : *psn/fyuA* (*pesticin receptor/ ferric yersiniabactin receptor*) qui codent des recepteurs externes ; *ybtP* et *ybtQ* (97) qui codent des récepteurs transmembrannaires;
- Régulation : *ybtA* est un activateur transcriptionnel des gènes des recepteurs (*psn/fyuA*, *ybtP*) et de la synthèse de la yersiniabactine (*irp2*), et il est répresseur de son propre promoteur.

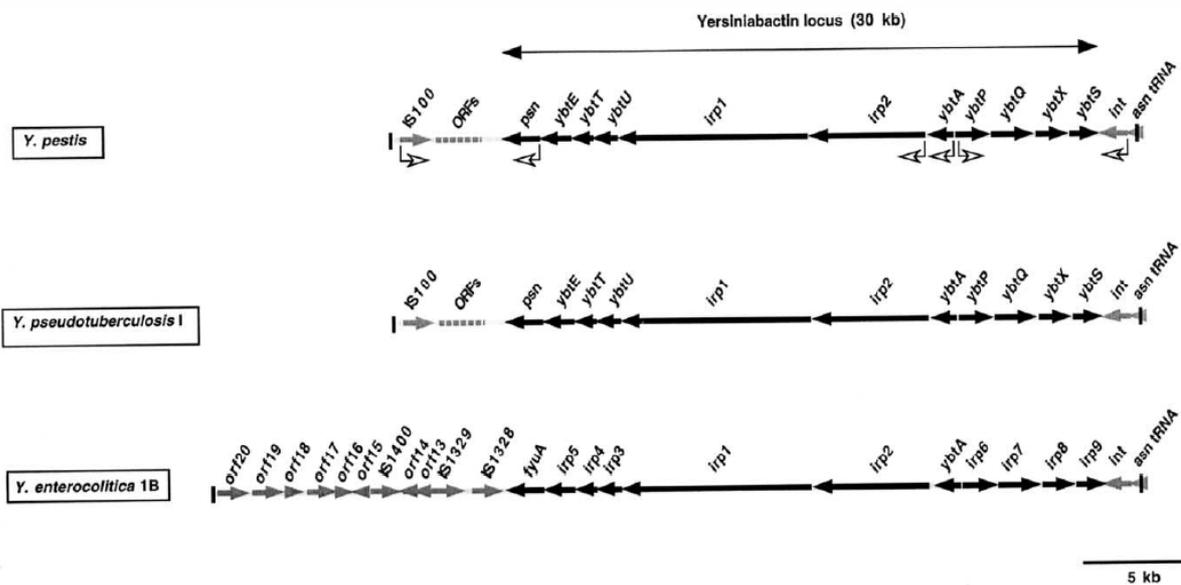


Figure 4 : Représentation de 3 îlots de pathogénicité hautement pathogène de *Yersinia sp*. Les flèches noires représentent le locus de la yersiniabactine, les flèches grises les parties variables, les flèches blanches les opérons. Les orfs (*open reading frame*) numérotées sont probablement des gènes provenant de bactériophages. D'après Carniel 2001 (45).

Tableau1 : Locus de la yersiniabactine de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* : gènes, produits, fonctions. D'après Carniel 2001 (45).

Gene designation in <i>Y. pestis</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Gene designation in <i>Y. enterocolitica</i>	Product	Predicted molecular mass	Putative or proven function
<i>ybtS</i>	<i>irp9</i>	YbtS	48 kDa	salicylate synthesis
<i>ybtX</i>	<i>irp8</i>	YbtX	44 kDa	UN
<i>ybtQ</i>	<i>irp7</i>	YbtQ	66 kDa	inner membrane permease
<i>ybtP</i>	<i>irp6</i>	YbtP	66 kDa	inner membrane permease
<i>ybtA</i>	<i>ybtA</i>	YbtA	35 kDa	activator
<i>irp2</i>	<i>irp2</i>	HMWP2	228 kDa	peptide synthetase
<i>irp1</i>	<i>irp1</i>	HMWP1	348 kDa	peptide/polyketide synthetase
<i>ybtU</i>	<i>irp3</i>	YbtU	41 kDa	UN
<i>ybtT</i>	<i>irp4</i>	YbtT	30 kDa	thioesterase?
<i>ybtE</i>	<i>irp5</i>	YbtE	56 kDa	salicyl-AMP ligase
<i>psn</i>	<i>fyuA</i>	Psn/FyuA	71 kDa	outer membrane receptor

UN: unknown.

4- Îlot de pathogénicité

L'îlot a d'abord été décrit chez *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* biotype 1B: (i) il s'agit d'un grand fragment chromosomique d'ADN (35 - 45 kb); (ii) il porte les gènes de virulence, en particulier le locus de la yersiniabactine indispensable à l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia sp.*; (iii) il s'insère au niveau de la terminaison 3' du gène de l'ARN de transfert de l'asparagine (*asn ARNt*); (iv) le taux de G+C% est différent de celui du reste du chromosome et, (v) il est flanqué de séquences répétées (43, 44), (figure 4). Cet îlot contient de nombreux gènes, dont le locus de la yersiniabactine: sa fonction essentielle est de capter des molécules de fer essentielles à la croissance et à la dissémination de la bactérie. Dans la région 3', la présence d'une intégrase (*int*) et de sites *att* (site d'intégration) similaires à ceux du phage P4 avec un contenu G + C% plus élevé que le reste du chromosome, suggère que l'HPI a été acquis par intégration chromosomique du phage. A proximité du gène de l'intégrase se trouve le locus de l'*asn* (gène codant pour l'ARN de transfert de l'asparagine). Les deux extrémités de l'HPI sont bordées par une séquence répétée de 17 paires de bases identiques. Alors que la région 3' semble relativement conservée dans l'HPI de *Yersinia spp.*, elle est variable dans la partie 5' (figure 4). Des HPI ont été retrouvés chez d'autres entérobactéries telles que *E. coli*, *C. diversus*, *Klebsiella*

spp., *Samonella enterica* : elles résulteraient d'un transfert horizontal à partir du chromosome de *Yersinia* (10, 45, 199). Dans certaines entérobactéries, l'HPI est relativement conservé (*E.coli*, *C. diversus*, *K. pneumoniae*), mais des délétions ont été observées chez d'autres (*K. oxytoca*) (10). Koczura *et al.* ont étudié l'organisation de l'HPI de 34 souches de *K. pneumoniae* isolées de prélèvements cliniques divers (146). Parmi ces souches, seules 6 avaient un HPI (PCR positive pour les primers permettant de détecter les gènes de synthèse de la yersiniabactine, *irp1* et *irp2*, et le récepteur de la yersiniabactine, *fyuA*). Quatre de ces 6 souches avaient un gène *fyuA* de 750 paires de bases (pb) alors le fragment correspondant chez *Y. pestis* est de 780 pb. L'étude de l'HPI de quatre souches a montré une diversité de l'organisation des gènes avec une délétion d'une ou plusieurs régions (figure 5). En revanche l'HPI se trouve toujours à proximité du gène de l'ARNt de l'asparagine (146).

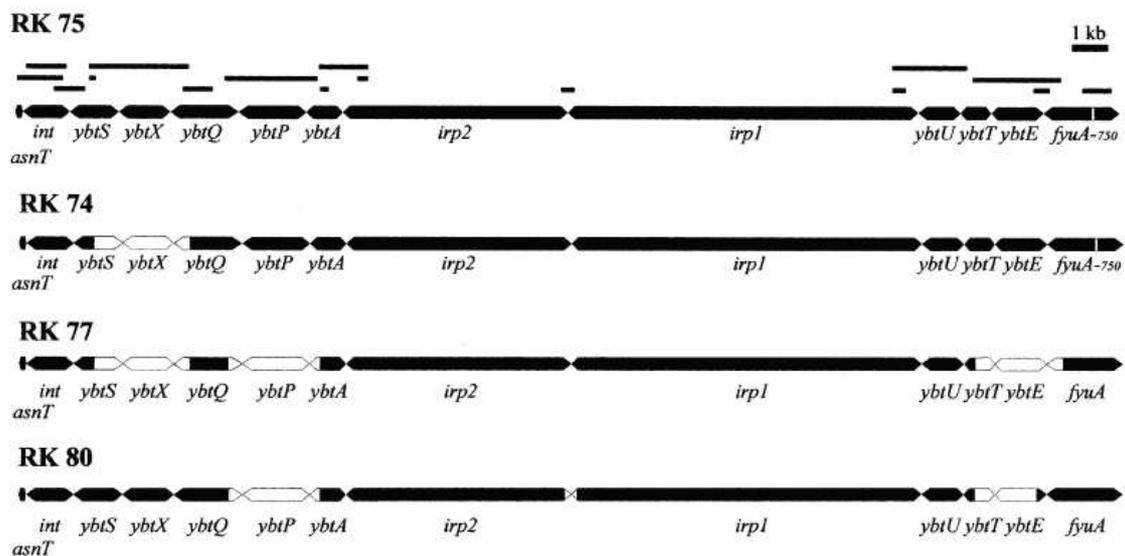


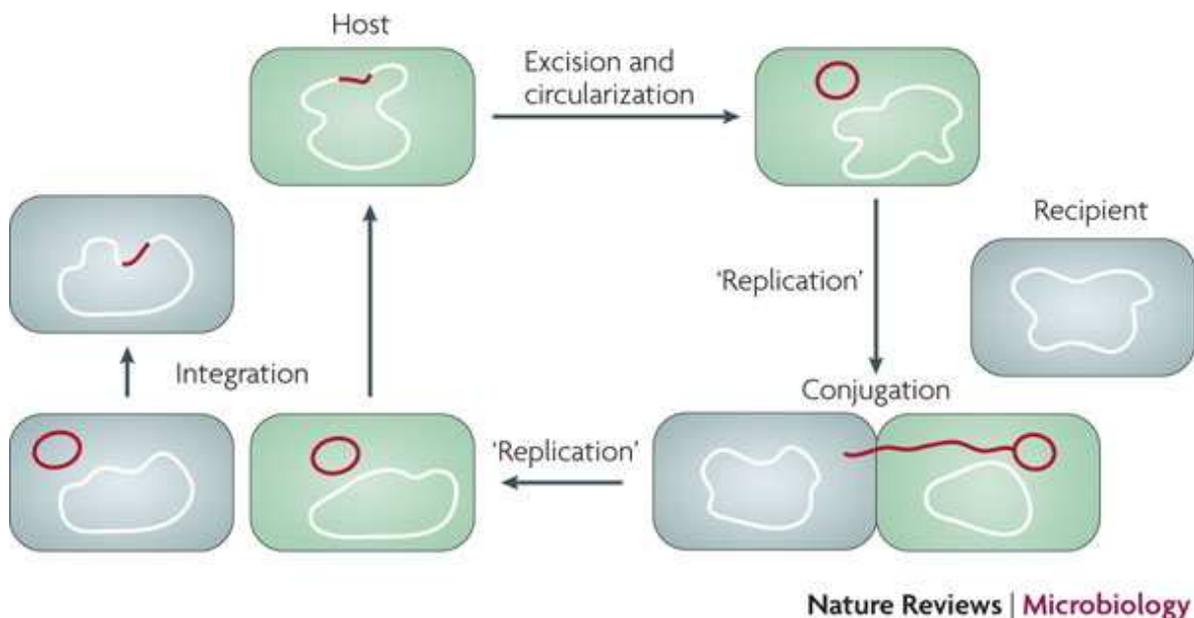
Figure 5 : Comparaison de l'organisation génétique de l'HPI de *Yersinia* spp. dans 4 souches de *K. pneumoniae*. Les polygones noirs représentent les gènes présents et les polygones blancs les gènes absents. Les traits noirs représentent les zones amplifiées. D'après Koczura *et al.* (146).

5- « **Intégrative and Conjugative Element** » (ICE, élément d'intégration et de conjugaison)

Le transfert horizontal de gènes, intra-espèces et inter-espèces, joue un rôle essentiel dans l'évolution et la capacité d'adaptation des bactéries (82, 189, 131). Trois mécanismes principaux, la transformation, la transduction et la conjugaison (78), permettent à des populations bactériennes d'acquérir des gènes par transfert horizontal de répondre ainsi rapidement aux défis et stress environnementaux (119). En effet, certaines bactéries pathogènes possèdent des gènes de survie (ou de virulence en cas d'infection de l'hôte) que l'on ne retrouve pas dans des clones ou des espèces étroitement liées mais non pathogènes. Ces clusters sont probablement situés sur des phages ou des plasmides, mais sont souvent retrouvés associés à des îlots de pathogénicité sur le chromosome (114, 118).

Des éléments qui s'excisent et s'intègrent comme des prophages et sont transférés par conjugaison comme des plasmides, ont été trouvés dans différentes bactéries. Ces éléments semblent avoir des caractéristiques très diverses telles que (i) l'utilisation de pili pour le contact de cellule à cellule, l'agrégation des cellules, le transfert de simple brin ou double brin d'ADN, (ii) une spécificité faible ou élevée d'intégration et (iii) des sérines ou des tyrosines recombinases. Des recombinases peuvent catalyser l'intégration et l'excision de fragments d'ADN circulaires (intégrases, resolvases), ou l'inversion de fragments d'ADN (invertases). L'intégration des gènes se fait au niveau de l'asparagine de l'ARNt (*asn* ARNt) situé à l'extrémité 3'. Cela a conduit à une nomenclature très hétérogène, incluant transposons conjugatifs, plasmides intégratifs, îlots génomiques et à de nombreux éléments non classés. Tous ces éléments sont excisés au niveau de sites de recombinaison, transférés sous forme circulaire par conjugaison et sont intégrés au niveau d'un site spécifique situé dans le génome de la cellule hôte (figure 6). Alors que la réplication de la forme circulaire survient sans doute pendant la conjugaison, cette réplication n'est pas impliquée dans le maintien de l'élément. Ces éléments évoluent

par acquisition ou échanges de fragments d'ADN avec divers éléments génétiques transférables. Ces éléments, tout comme les plasmides conjugatifs et les prophages, seraient responsables de transfert horizontal de gènes (279). V. Burrus et al ont proposé en 2002 de les classer comme des éléments d'intégration et de conjugaison, ICE (*Integrative and Conjugative Elements*) (32).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 6 : Différentes étapes d'intégration de l'ADN dans la cellule hôte. Un élément d'intégration et de conjugaison (ICE) est intégré au niveau d'un seul site dans le chromosome de l'hôte et est flanqué par des séquences spécifiques sur la droite (*attR*) et la gauche (*attL*). Après excision, se forme une molécule circulaire fermée résultant d'une liaison d'une recombinaison entre *attL* et *attR* pour donner l'*attP* (dans l'ICE) et l'*attB* (dans le chromosome de l'hôte). Une cellule dénuée d'ICE-libre peut servir de cellule réceptrice. Au cours de la conjugaison, le donneur et le receveur sont mis en contact étroit, et un ADN simple brin est transféré vers la cellule hôte grâce à l'action de la réplication en cercle roulant. Après le transfert, l'ADN polymérase de la cellule réceptrice synthétise le brin complémentaire ce qui conduit à la formation d'un ADN circulaire double brin. L'intégration de l'ICE dans la cellule hôte se fait par une nouvelle recombinaison entre *attP* et *attB*. D'après Wozniak et al. (279).

Le premier ICE découvert a été le transposon caractérisé Tn916 isolé chez *Enterococcus faecalis* (105), et ces éléments ont surtout été étudiés chez

Streptococcus sp. et *Bacteroides* sp. Les ICE sont associés aux îlots de pathogénicité : ils contiennent des clusters de gènes associés à la virulence et sont reliés au caractère pathogène d'une souche bactérienne. En 2004, Schubert *et al.* ont caractérisé l'îlot de pathogénicité d'une souche d'*E. coli*, *E. coli* ECOR31, nommé HPI_{ECOR31} (235). L'HPI_{ECOR31} est un fragment d'ADN de 35 kb situé à l'extrémité 3' exactement où est inséré l'IS100 de *Y. pestis* et de *Y. pseudotuberculosis*. Ce fragment d'ADN comprend 3 régions distinctes. Comme tous les HPIs, HPI_{ECOR31} s'insère au niveau du locus de l'*asn* ARNt, possède le gène d'une intégrase (*int*) à une extrémité, et code pour des facteurs de virulence et le système de sidérophore de la yersiniabactine. L'induction de l'intégrase entraîne une excision et une circularisation de l'HPI_{ECOR31} complet. Cependant, l'HPI_{ECOR31} est deux fois plus grand que les autres HPIs décrits car il possède un fragment d'ADN additionnel non observé à ce jour dans les autres HPIs et situé à droite de l'extrémité de l'HPI. Ce fragment code le système de synthèse et d'assemblage des pili nécessaire au transfert d'ADN. L'HPI_{ECOR31} possède à la fois des structures communes et distinctes aux HPIs des autres souches d'*E. coli*, de *Yersinia* sp. et d'autres *Enterobacteriaceae* (figure 7).

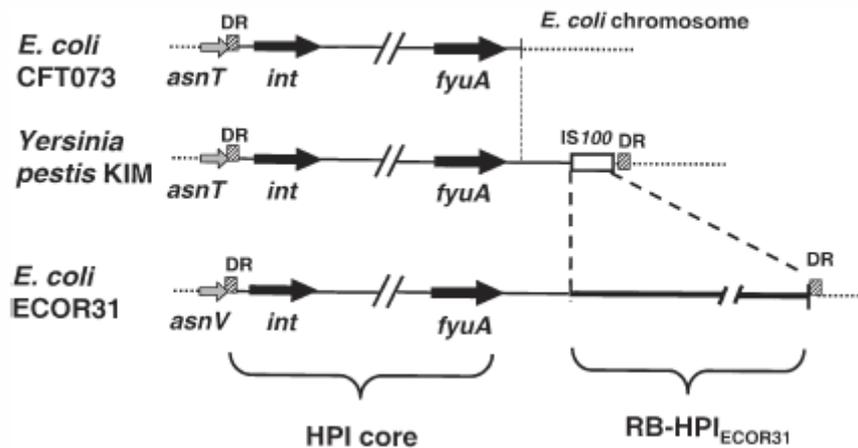


Figure 7 : Comparaison de la structure de différents HPI : *E. coli* ECOR31, *Y. pestis* et *E. coli* CFT073. D'après Schubert *et al.* (235).

Les flèches grises indiquent le site d'intégration de l'HPI (asparagine des gènes de l'ARNt ou *asnT* ou *asnV*), le site *attO* indiqué par des cases hachurées représentant les séquences répétées de 17 paires de bases (DR) flanquant l'HPI de *Y. pestis* et de *E. coli* ECOR31. Des lignes en pointillés noirs indiquent le chromosome voisin. Les flèches noires indiquent les gènes *int* et *fyuA* marquant la limite du core de l'HPI. RB-HPI_{ECOR31} définit la localisation des 34 480 pb supplémentaires bordant la partie droite de l'HPI de la souche de *E. coli* ECOR31.

L'intégration chromosomique, l'excision et les recombinaisons génétiques de l'HPI_{ECOR31} sont proches du site spécifique de recombinaison du phage lambda. En effet, comme le phage lambda, l'HPI passe par une forme intermédiaire circulaire extra-chromosomique. Les recombinaisons se font au niveau de sites identiques sur le chromosome et l'HPI. L'HPI_{ECOR31} s'intègre au niveau d'un site de recombinaison chromosomique, l'*attB*. L'intégration et l'excision se font grâce à une intégrase (*int*). Après excision et circularisation, un site spécifique *attP* est créé. Les jonctions chromosomiques droite et gauche de l'HPI_{ECOR31} (*attR*, *attL*) sont formées par la recombinaison de l'*attB* chromosomique et l'*attP* de l'HPI_{ECOR31}. Après transfert dans la cellule réceptrice, l'HPI_{ECOR31} est intégré au niveau de l'extrémité 5' gène de l'*asn* ARNt (figure 8).

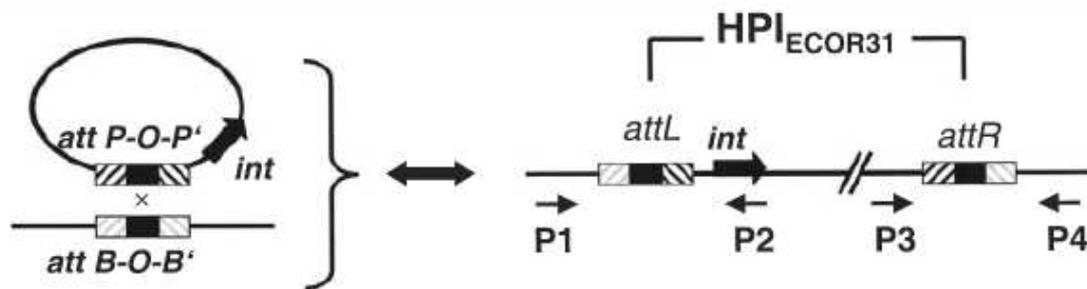


Figure 8 : Recircularisation de l' HPI_{ECOR31} . D'après Schubert *et al.* (235). L' HPI_{ECOR31} s'intègre spécifiquement au niveau du site *attB* chromosomique. L'intégration et l'excision de l'élément sont médiées par une intégrase (*int*). Les extrémités gauche et droite de l' HPI_{ECOR31} , *attL* et *attR*, (site d'attachement de l'intégrase) sont formées par la recombinaison entre l'*attB* et l'*attP* de l' HPI_{ECOR31} . Après l'excision chromosomique et la circularisation, un site spécifique de recombinaison (*attP*) est créé. L' HPI_{ECOR31} est représenté par des lignes noires, le gène de l'intégrase par une flèche noire, et l'ADN chromosomique voisin en gris. Le site *attP* (P-O-P) est représenté par des cases noires hachurées encadrant le O (cases noires pleines) constituant le core du site d'attachement, le site *attB* est montré en gris.

L' HPI_{ECOR31} répondant aux critères de structure de l'ICE définis par Burrus *et al.*, il a été nommé *ICEEc1*. Il semble que l'*ICEEc1* serait transféré par un système de sécrétion de type IV analogue à un transfert de plasmide par conjugaison.

L'ICE de *K. pneumoniae*, *ICEkp1* a récemment été décrit par Lin *et al* (159). En comparant la séquence complète de deux souches de *K. pneumoniae*, NTUH-K2044 responsable d'abcès hépatique (281) et MGH78578 responsable d'infection pulmonaire (191), la présence d'un ICE contenant un HPI uniquement dans la souche NTUH-K2044 a été mise en évidence, nommé *ICEkp1*. Il s'agit d'un fragment d'ADN de 76 kb s'intégrant au niveau du gène codant l'*asn ARNt* et flanqué par une séquence répétée de 17 pb (figure 9). Le taux de G+C% est de 58% comparé à 52% dans le reste du génome. Ce qui suggère que cette portion chromosomique a été acquise par transfert horizontal. L'analyse de la séquence nucléotidique de ce fragment d'ADN a montré qu'il était divisé en trois régions fonctionnelles et qu'il avait une structure comparable à celle de l'*ICEEc1* de la souche ECOR31. La région 5' est

similaire à l'HPI de *Yersinia* sp. responsable de la synthèse de la yersiniabactine et associée à la virulence de la bactérie. La région moyenne était similaire à une partie du plasmide pLVPK (53) de la souche de *K. pneumoniae* CG43 et la région 3' comportait les gènes de transfert et mobilisation de l'ICE de la souche d'*E.coli* ECOR31 (figure 10). L'ICE s'insère au niveau de l'*asn* de l'ARNt. La comparaison des 4 gènes de l'*asn* ARNt des souches de *E. coli* et des deux souches de *K. pneumoniae* (NTUH-K2044 et MGH78578) a montré qu'il y avait une inversion au niveau de l'*asn2* et 4 de la souche de MGH78578 (figure 11).

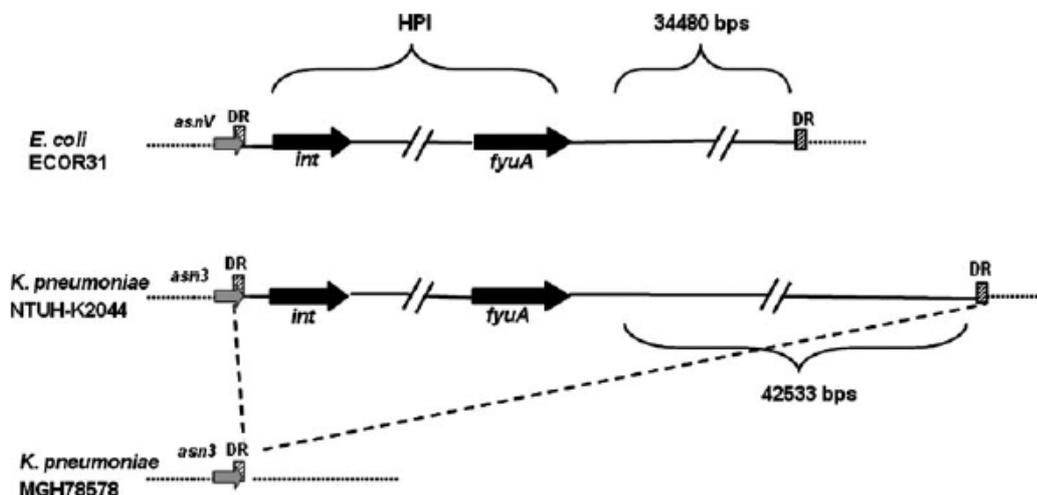


Figure 9 : Représentation schématique de la portion de 76 kb. Les lignes en pointillé indiquent l'insertion dans la souche de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 comparée à la souche MGH78578. L'insertion est située au niveau du gène de l'*asn* ARNt de l'asparagine indiqué par des flèches grises. Les boîtes hachurées (DR) indiquent le site d'attachement *attO* composé d'une séquence répétée de 17 pb. Les flèches noires indiquent l'intégrase et les gènes *fyuA* (récepteur de la yersiniabactine) situés dans les parties terminales 5' et 3' de l'HPI. Des fragments de 34480 pb et 42533 pb suivent respectivement l'HPI de *E.coli* ECPR31 et de *K. pneumoniae* NTU-K2044. Lin TL *et al* (159).

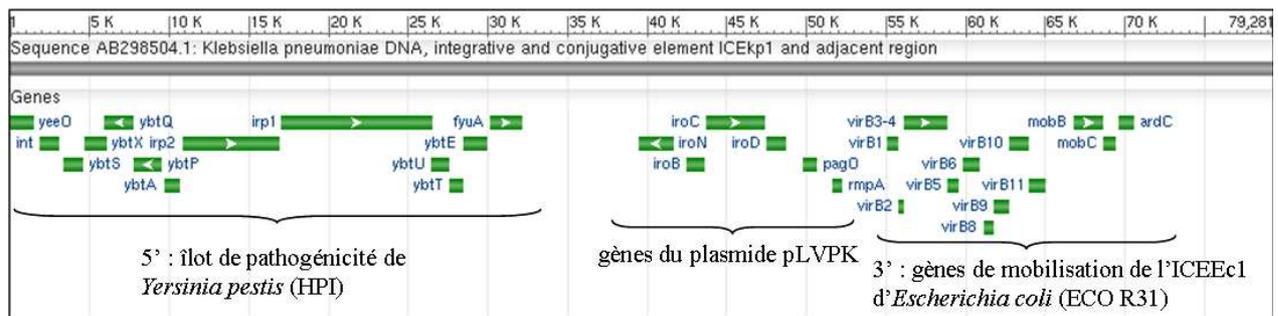


Figure 10: Représentation schématique de l'ICEkp1.

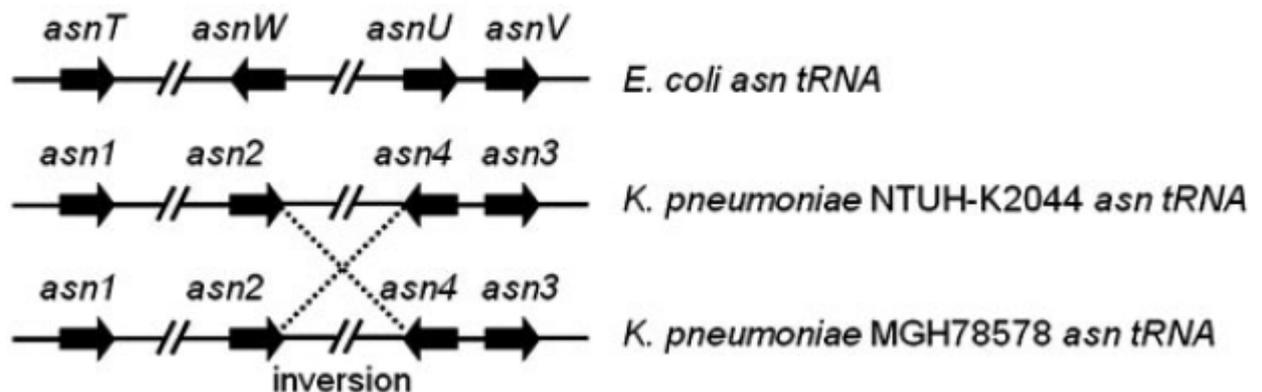


Figure 11 : Représentation de l'alignement des *asn* ARNt dans les souches d'*E. coli* ECPR31, *K. pneumoniae* NTUH-K2044, *K. pneumoniae* MGH78578. Lin TL *et al* (159).

6- Autres gènes de virulence

- Deux régions chromosomiques ont récemment été identifiées chez la souche de *K. pneumoniae* NTUH-2044 (National Taiwan University Hospital) (281), isolée d'un abcès hépatique associé à une méningite, alors qu'elles sont absentes du génome de la souche MGH78758 isolée d'une infection pulmonaire (191) :

- Gènes du métabolisme de l'allantoïne

Les gènes intervenant dans le métabolisme de l'allantoïne, produit terminal d'élimination du métabolisme purique est l'une des régions identifiées chez la souche NTUH-K2044 (56). Cette région de 22-kb comprend 14 gènes dont le gène *allS* qui code un activateur de l'expression du régulon allantoïne. Cette région ne semble pas constituer un îlot de pathogénicité car elle ne contient pas d'intégrase ou de gènes

de mobilité. Elle est significativement plus fréquemment présente chez les souches isolées d'abcès du foie (56). Dans un modèle expérimental d'infection intra-gastrique murin, la délétion de cette zone s'accompagne d'une réduction de la virulence. Par ailleurs, il a été montré que *K. pneumoniae* utilise l'allantoïne comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie en aérobiose comme en anaérobiose. Certains patients ayant des pathologies chroniques rhumatismales, pulmonaires ou un diabète non-insulino-dépendant ont des concentrations sériques élevées en allantoïne. Certaines observations rapportent une fréquence accrue des abcès chez des patients ayant un diabète non insulino-dépendant. L'augmentation de la concentration d'allantoïne sérique pourrait constituer un facteur favorisant le développement des abcès (56).

-Région du système *kfu*

Ma *et al.* ont mis en évidence une région chromosomique au niveau de la souche d'environ 20 Kb contenant un système de captation du fer, *kfu*, un système de phosphoénolpyruvate sucre phosphotransférase (PTS) et, plusieurs gènes dont la fonction est encore inconnue. La présence de la région *kfu* apparaît également plus fréquente chez les souches invasives (167).

- **Gene *uge***

L'étude de Regué *et al* (224) a montré qu'une mutation sur le gène *uge* codant pour l'UDP galacturonate 4-épimérase rend les souches de *K. pneumoniae* dépourvues de LPS et de capsule. Ces souches mutantes sont incapables de provoquer une infection urinaire ou pulmonaire chez la souris. Le gène *uge* ne semble pas avoir de lien avec la présence ou l'absence de phénotype hypermuqueux (288).

III- Résistance de *K. pneumoniae* aux antibiotiques

1- Sensibilité naturelle de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae appartient au groupe 2 de la classification des entérobactéries en fonction de leur résistance naturelle aux β -lactamines. Cette espèce possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase

chromosomique (avec plusieurs variants SHV, LEN, OKP) qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines (amino-, carboxy- et uréido-pénicillines). Cette pénicillinase est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam). Ainsi, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes.

Concernant les autres antibiotiques, *K. pneumoniae* est sensible aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la fosfomycine et au cotrimoxazole.

2- Résistances acquises de *K. pneumoniae*

Depuis toujours et pour des raisons encore inconnues, *K. pneumoniae* joue un rôle majeur dans l'apparition et/ou la dissémination des mécanismes de résistance, en particulier vis-à-vis des β -lactamines.

K. pneumoniae a toujours été une plaque tournante dans la résistance aux antibiotiques. Ainsi, dans les années 1970, ces bactéries ont été pionnières pour les résistances aux aminosides (57). A partir des années 80, *K. pneumoniae* a largement contribué à la dissémination hospitalière des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui leur confèrent une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (195, 245). Plus récemment, cette espèce occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux carbapénèmes (KPC, OXA-48). Lorsque l'on fait un bilan des nouvelles β -lactamases décrites depuis 1983, *K. pneumoniae* est dans 80% des cas l'hôte chez qui ont été découvertes ces nouvelles enzymes (de type TEM, SHV ou de la classe C) (8, 195). Lorsqu'elle n'est pas le premier hôte, on retrouve très fréquemment cette espèce comme responsable de la diffusion épidémique de nouvelles enzymes comme les métallo-enzymes de type VIM (139, 277).

IV- Rappel sur les mécanismes d'action et de résistance aux β -lactamines

1- Généralités

Les β -lactamines, pour leur large spectre antibactérien, leur activité bactéricide temps-dépendant et leur faible toxicité, constituent la famille d'antibiotiques la plus vaste et la plus prescrite. Elles comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes, et ont toutes en commun le cycle β -lactame. Le cycle β -lactame se comporte comme un substrat suicide d'enzymes impliquées dans les étapes finales de la biosynthèse du peptidoglycane, hétéropolymère essentiel de la paroi bactérienne. La biosynthèse du peptidoglycane est assurée grâce à des enzymes de nature variée, situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique. Ces enzymes, les DD-transpeptidases et DD-carboxypeptidases, possèdent un site actif à sérine et sont regroupées sous le terme de PLPs, Protéines Liant la Pénicilline (ou PBP pour *Penicillin Binding Protein*). Au sein des entérobactéries, les PLPs, ainsi que leur affinité pour les β -lactamines, diffèrent d'une espèce à l'autre, expliquant les variations de profils de sensibilité aux β -lactamines chez les souches sauvages. Par analogie structurale avec le motif D-Ala-D-Ala, substrat naturel des PLPs, le cycle β -lactame se lie de manière covalente et irréversible au site actif de l'enzyme provoquant son inactivation. L'inhibition de l'activité trans- et carboxy-peptidase conduit à un arrêt de la croissance bactérienne (effet bactériostatique) et à la lyse des bactéries (effet bactéricide). Ainsi, à chaque génération, 40 à 50% du mur cellulaire est dégradé et 90% des composants du polypeptidoglycane sont recyclés.

2- Résistance aux β -lactamines

La résistance naturelle ou acquise aux β -lactamines est caractérisée par au moins quatre mécanismes qui peuvent par ailleurs être combinés :

- modification d'affinité de la cible (PLP) ;
- diminution de la perméabilité de la membrane externe ;

- expression d'une pompe d'efflux actif ;
- et enfin inactivation enzymatique par les β -lactamases, constituant le mécanisme principal de la résistance naturelle et acquise des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines.

- La diminution d'affinité de la cible pour les β -lactamines a été décrite pour plusieurs espèces de cocci à Gram positif tels que les staphylocoques Mécicilline-résistants (expression d'une nouvelle PLP2a), les pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (expression de PLPs mosaïque après recombinaison homologue) et les entérocoques par surexpression de la PLP5.
- La diminution de la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif constitue un autre mécanisme de résistance aux β -lactamines. Les β -lactamines, pour atteindre leurs cibles situées sur la membrane cytoplasmique, doivent diffuser au travers de porines en fonction de leur charge, de leur masse moléculaire et de leur polarité. La délétion de porine entraîne l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour certaines β -lactamines chez certaines entérobactéries (*Enterobacter* spp., *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *E. coli*) ainsi que chez *Pseudomonas aeruginosa*.
- L'expression d'une pompe d'efflux actif provoquant le rejet de l'antibiotique depuis l'espace périplasmique vers le milieu extérieur est également impliqué dans la résistance aux β -lactamines de certaines souches de *P. aeruginosa* et de *Stenotrophomonas maltophilia*. Plusieurs types de pompe ont été décrits, déterminant les molécules concernées et le profil de résistance.
- Enfin, la production bactérienne de β -lactamases, enzymes apparentées aux PLPs, capables d'hydrolyser et d'inactiver le cycle β -lactame, constitue le principal mécanisme de résistance naturelle ou acquise aux β -lactamines chez les entérobactéries.
Ces enzymes d'inactivation, d'une extrême diversité, sont capables d'hydrolyser les β -lactamines avec ouverture du cycle β -lactame et

production de dérivés inactifs. Elles sont sécrétées dans le milieu extérieur chez les bactéries à Gram positif et dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif. Pour ces derniers, l'activité de la β -lactamase, est donc conditionnée par la perméabilité de la membrane externe aux différentes β -lactamines. Elles ont une affinité différente pour les pénicillines, les céphalosporines et les inhibiteurs de β -lactamases.

Les β -lactamases peuvent être chromosomiques, présentes chez toutes les souches d'une même espèce (résistance naturelle) ou acquises chez une souche particulière par suite de transferts génétiques à partir d'éléments génétiques mobiles (acquisition de plasmides ou de transposons).

C'est principalement au sein de la classe A (pénicillinases) et de la classe C (céphalosporinase) que l'évolution de la résistance aux β -lactamines a été observée en clinique depuis les années 1980, conférant, en particulier, aux entérobactéries une résistance acquise aux C3G.

L'utilisation massive des β -lactamines en thérapeutique humaine et vétérinaire confère à ces espèces un avantage sélectif favorisant leur émergence et la dissémination de leur matériel génétique.

Jusqu'aux années 80, la résistance des entérobactéries aux β -lactamines existantes (pénicillines à large spectre, C1G) était principalement due aux enzymes plasmidiques de la classe A (TEM-1 et SHV-1) et de la classe D (comme OXA-1). A cette époque, de nouvelles β -lactamines stables à ces enzymes ont été introduites : elles comprenaient les céphamycines, les C3G, les carbapénèmes, les monobactames et les associations à des inhibiteurs de β -lactamase.

Sous cette nouvelle pression de sélection, de nouveaux mécanismes de résistance ont fait leur apparition : enzymes dérivées d'enzymes existantes, ou hyperproduites. Dans ce domaine, *K. pneumoniae* a joué un rôle central et deux exemples frappants en témoignent : l'émergence de BLSE dans les années 1980 et plus récemment l'émergence et la propagation des enzymes conférant une résistance aux carbapénèmes.

3- Classification et évolution des β -lactamases : place de *K. pneumoniae*

a- Classification des β -lactamases

Le nombre élevé et la diversité des β -lactamases ont conduit à la nécessité d'en faire la classification.

Proposée en 1980, **la classification de Ambler** (4), dite structurale, est basée sur la structure primaire de l'enzyme, notamment du site actif. Elle individualise quatre classes moléculaires A, C, D (appelées sérines enzymes) et B (dont les enzymes comportent deux atomes de zinc au niveau de leur site actif).

- La classe A correspond aux pénicillinases et aux β -lactamases chromosomiques ou plasmidiques sensibles à l'acide clavulanique.
- La classe B comprend les métalloenzymes, inhibées par l'EDTA.
- La classe C inclut les céphalosporinases résistantes à l'acide clavulanique, habituellement chromosomiques.
- La classe D rajoutée après la description originale regroupe les oxacillinases.

La seconde classification, dite fonctionnelle, élaborée en 1989 et réactualisée en 1995, est basée (i) sur les propriétés fonctionnelles des enzymes, (ii) sur le spectre de substrats préférentiels des enzymes et (iii) sur leur comportement par rapport aux inhibiteurs. Cependant, la limite évidente de cette classification est que des mutations ponctuelles des gènes de β -lactamases peuvent modifier significativement les spectres d'activité pour les différents substrats ou pour les inhibiteurs, ce qui n'est pas le cas pour la classification de Ambler qui reste valable pour les enzymes mutées (33).

- Le groupe 1 comprend les β -lactamases chromosomiques de la classe C (type AmpC). Les bactéries produisant de telles β -lactamases sont résistantes à bas niveau aux pénicillines, aux inhibiteurs de β -lactamases, à la cefoxitine (en fonction des espèces). La production de ces enzymes est inductible par différents antibiotiques parmi lesquels : la cefoxitine, l'acide clavulanique ou encore l'imipénème.

- Le groupe 2 est de loin le plus vaste et comporte des β -lactamases le plus souvent inhibées par l'acide clavulanique. La plupart de ces enzymes ont un support plasmidique et toutes appartiennent à la classe moléculaire A, exceptées les oxacillinases qui appartiennent à la classe D.
- Le groupe 3 regroupe les métallo- β -lactamases de la classe B conférant la résistance à la quasi-totalité des β -lactamines (carbapénèmes, céphalosporines et pénicillines) excepté les monobactames et sont inhibées par les agents chélateurs (EDTA) mais pas par l'acide clavulanique.
- Le groupe 4 rassemble moins d'une dizaine d'enzymes, peu rencontrées à ce jour, insensibles à l'acide clavulanique, et ne pouvant être classées parmi les autres groupes.

Grâce aux banques de données donnant accès aux séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques, il est désormais possible de relier ces deux classifications : une synthèse figure dans le tableau 2.

Tableau 2 : Classification des β-lactamases d'après Bush-Jacoby-Medeiros (33)

Classe moléculaire (Ambler)	Groupes fonctionnels (Bush & al.)	Type de β-lactamase et exemples représentatifs	Bactéries impliquées	Inhibition par acide clavulanique	Inhibition par EDTA	β-lactamines hydrolysées	β-lactamines stables	
β-lactamases à sérine active	2a	Pénicillinases	Bactéries à Gram positif	++	-	Pénicillines sauf pénicillines M	Pénicillines M, C1G, carbapénèmes	
	2b	β -lactamase à large spectre TEM-1 & 2, SHV-1 plasmidiques et chromosomiques	Bactéries à Gram négatif	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztreonam	
	2be	β -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztreonam SHV-2 à 9, TEM-3 à 29, VEB-1, plasmidiques	Entérobactéries, Pseudomonas aeruginosa	++	-	Idem 2b + C3G et aztreonam	Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes	
	Classe A	2br	β -lactamases à large spectre résistant à l'ac clavulanique TRI : dérivé TEM-30 à -41, plasmidiques	Entérobactéries	-	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de β-lactamases	Idem 2b
		2c	Carbénicillases PSE-1, PSE-3, PSE-4 plasmidiques	Bactéries à Gram négatif	+	-	Idem 2b	Idem 2b
		2e	Céphalosporinases chromosomiques inhibées par l'acide clavulanique - Cefuroximase Cum A (<i>P. vulgaris</i>), - L2 (<i>S. maltophilia</i>)	Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries)	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G, certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztreonam, carbapénèmes
		2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibées par l'acide clavulanique Ex : IMI-1, NMC-A, chromosomiques	Entérobactéries	+	-	Idem 2b + aztreonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
Classe C	1	Céphalosporinase AmpC chromosomiques (Entérobactéries*, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.) et plasmidiques (CMY, FOX, MOX, MIR-1...)	Bactéries à Gram négatif	-	-	Toutes les β-lactamines sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes	
Classe D	2d	Oxacillinases OXA-1 à -20 plasmidiques et chromosomiques	Bacilles à Gram négatif	V	-	Idem 2b (+ parfois C3G, aztreonam ou carbapénème)	Variable	
Pas de classe attribuée	4	Enzymes indéterminées Ex : enzymes chromosomiques de <i>C. jejuni</i> , <i>C. cepacia</i> ...	Espèces variées	-	-	Variable	Variable	
β-lactamases Zinc-dépendances Classe B	3	Métallo-β-lactamases IMP-1/3 chromosomiques ou plasmidiques, enzymes chromosomiques de <i>Aeromonas</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>S. maltophilia</i> L1	Bactéries à Gram négatif	-	++	Large profil de substrats dont les carbapénèmes	Variable	

Inhibition : inhibiteur fort++, inhibiteur modéré+, négligeable -, V : variable

* *E. coli* (bas niveau), *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *M. morgani*, *S. marcescens*, *H. alvei*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*

b- Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

- **Les premières BLSE** décrites chez les entérobactéries (ou « vieilles BLSE ») confèrent la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), au céfépime et à l'aztréonam ; elles ont émergé au cours des années 80 suite à l'introduction de ces molécules en thérapeutique. Elles dérivent de 2 séries d'enzymes, TEM et SHV (TEM-1, TEM-2 et SHV-1), décrites depuis les années 60, par des mutations ponctuelles qui ont permis d'élargir le spectre d'hydrolyse. SHV-1 correspond à un gène de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* transposé sur un plasmide; en revanche l'origine de TEM1/2 reste à ce jour inconnue. Plus de 195 types de BLSE TEM et 143 types SHV ont été décrits (www.lahey.org/studies/webt.htm). Ces BLSE appartiennent à la classe moléculaire A et sont détectées par la mise en évidence d'une synergie dite en bouchon de champagne entre l'acide clavulanique et les C3G (132). Seuls les céfamycines et les carbapénèmes sont stables vis-à-vis de l'hydrolyse par les BLSE.
- **Les BLSE de type CTX-M** sont d'apparition plus récente. Leur dénomination de céfotaximase est liée à leur pouvoir hydrolytique plus important envers le céfotaxime comparé à la ceftazidime et « M » pour Munich» indiquant leur premier lieu d'isolement. Toutefois, certains types comme CTX-M-15 ou CTX-M-19 ont évolué vers un haut niveau de résistance à la ceftazidime (22). Il existe environ 90 types qui sont classés en 5 clusters (cluster CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25) (figure 12) selon les similarités de leurs séquences protéiques. Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs appartiennent au genre *Kluyvera*, entérobactéries d'isolement très rare en bactériologie médicale (22, 129). Ainsi le phylum CTX-M-2 dérive de la β -lactamase naturelle de *K. ascorbata* alors que le phylum CTX-M-8 provient de *K. georgiana* (208). Cette espèce serait également à l'origine du groupe 9 (192).

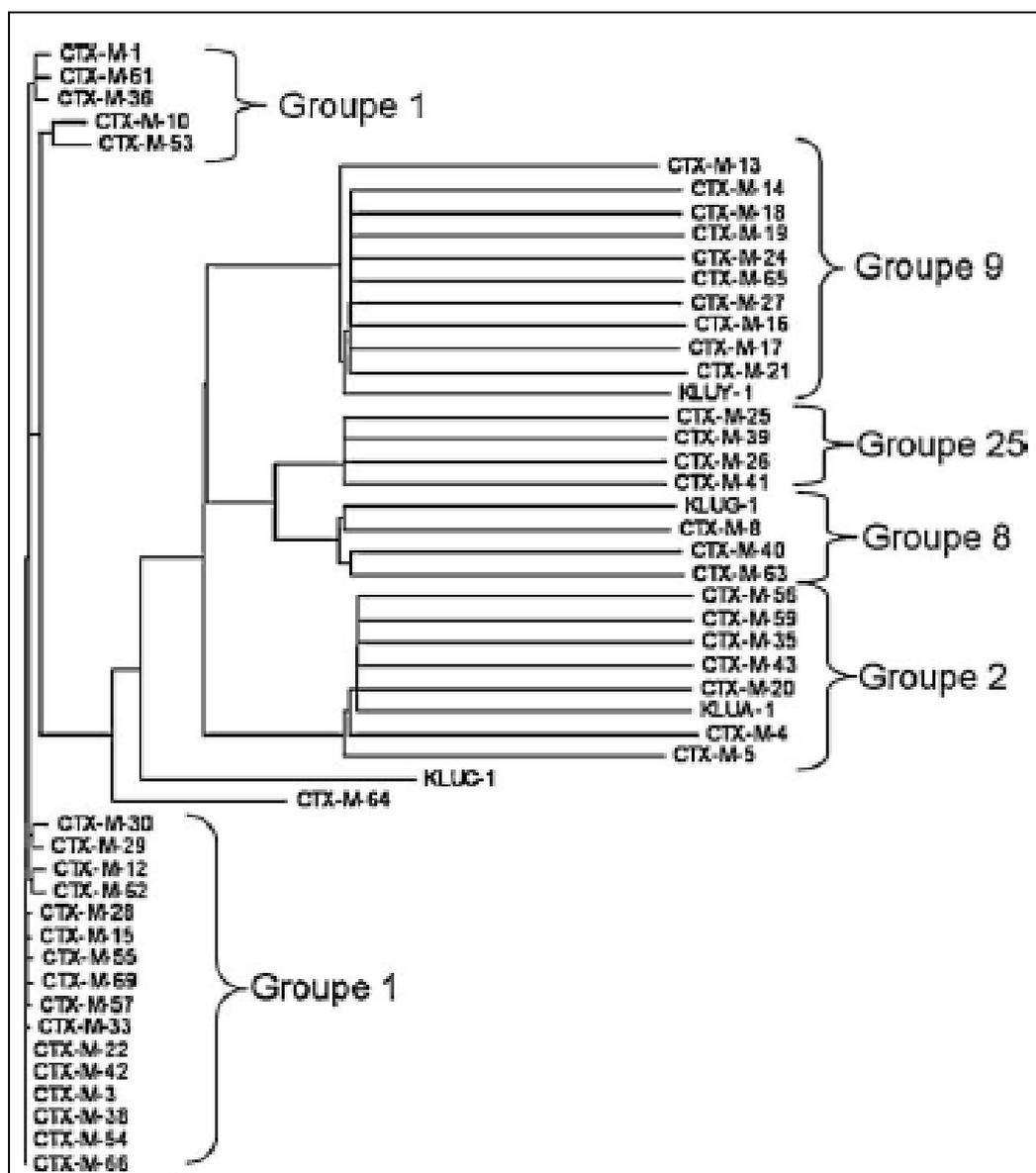


Figure 12 : Arbre Phylogénétique de la famille des CTX-M (22,230). D'après Ruppé et Bonnet *et al.*

- **Les autres BLSE** sont caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam plutôt qu'au céfotaxime ; elles ont une distribution moins large que le groupe CTX-M (8, 23). Dans ce groupe sont individualisées BES-1 (*brazilian extended spectrum*) (21), GES-1 (*Guyana extended spectrum*) (176), PER-1 (*Pseudomonas extended resistance*) (273), SFO-1 (*Serratia fonticola*) (Nass *et al.* 2008-2), TLA-1 (Tlahuicas, tribu mexicaine) (176), et enfin VEB-1 (*Vietnam extended spectrum*) (273, 176). Des enzymes proches de

GES-1 ont été découvertes en Grèce, malheureusement dénommées à tort IBC (*Integron Borne Cephalosporinase*) (IBC-1, IBC-2) (106).

- **Epidémiologie des BLSE**

C'est chez *K. pneumoniae* et *Serratia marcescens* qu'a été décrite la première BLSE de type SHV (SHV-2), en Allemagne, en 1983 (143). TEM-3, première de la série TEM, a été également décrite chez *K. pneumoniae* en France, en 1984 (244). Les premières CTX-M sont apparues en 1989 en Europe (CTX-M-1 chez *E. coli* et MEN-1 chez *K. oxytoca* en France) et en Argentine chez des salmonelles mineures productrices de CTX-M-2 (195).

Les BLSE de type TEM et SHV ont très rapidement et largement diffusé dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. Au cours des années 1990-98, elles ont été responsables de grandes épidémies de colonisations et d'infections nosocomiales, en particulier dans les unités de soins intensifs. Elles sont principalement liées aux espèces *K. pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* (195). En France, TEM-3 et SHV-4 étaient les enzymes les plus impliquées. La diffusion nationale d'un clone de *K. pneumoniae* producteur de SHV-4 a été largement rapportée (7). Il a été récemment démontré que la production de BLSE était un facteur de surmortalité important par rapport à des souches sensibles (255). Cette production de BLSE est médiée par des plasmides qui confèrent également aux souches des caractères de résistance à d'autres familles majeures d'antibiotiques comme les aminosides. De plus, chez *K. pneumoniae*, ces plasmides, ont une très grande stabilité. Ainsi, des années après l'arrêt de traitements par la ceftazidime ou d'autres C3G, des *K. pneumoniae* BLSE colonisent toujours certains malades (125). C'est au cours de cette période que les programmes de lutte contre la dissémination des entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) ont été mis en place en France. Les données de la surveillance ont permis de mettre en évidence le renversement de situation avec l'émergence des CTX-M. En effet, après une diminution significative des BLSE de type TEM et SHV, la prévalence des CTX-M a évolué de

manière explosive à la fin des années 90 (35, 198). Ces dernières sont devenues endémiques sur tous les continents (36, 124), (figure 13). Elles ont été décrites chez toutes les entérobactéries avec une prédominance chez *E. coli*. Les EBLSE de type CTX-M sont responsables de cas d'infections communautaires mais aussi d'épidémies nosocomiales (48). L'épidémiologie actuelle est dominée par la diffusion de l'enzyme CTX-M-15 (109, 229). Bien que *E. coli* producteur de CTX-M représente actuellement la majorité des EBLSE, on observe depuis quelques années une ré-augmentation de la prévalence des *K. pneumoniae* BLSE dans les hôpitaux (figure 14) : à l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), leur densité d'incidence a doublé entre 2005 et 2010, passant de 0,06 à 0,1/1000JH. Les données Françaises relevées sur le réseau de surveillance Européen (EARSS) confirment cette tendance (90).

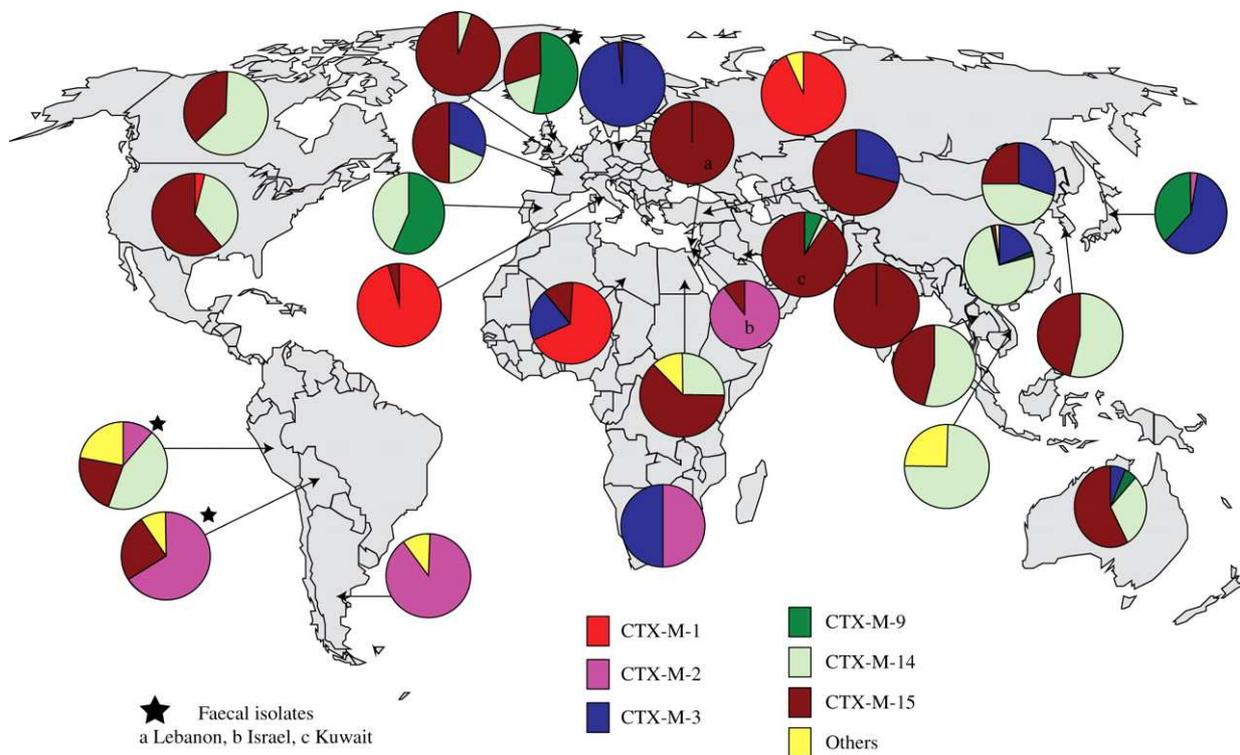
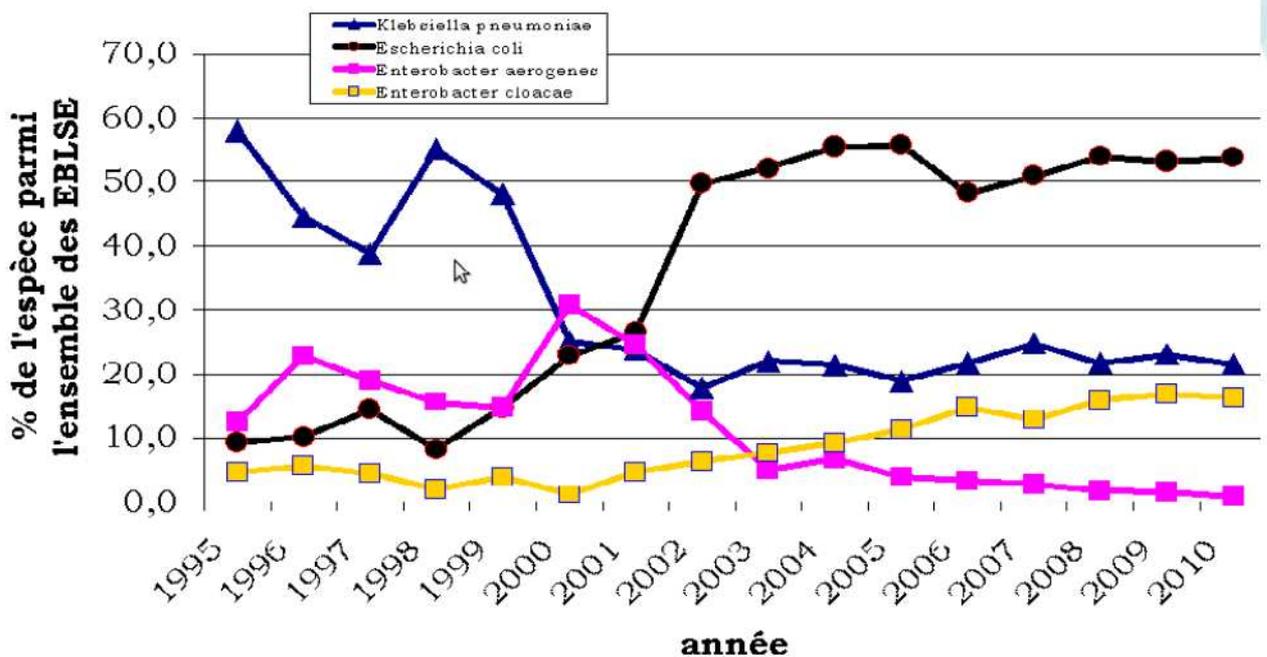


Figure 13: distribution mondiale de genotypes de CTX-M. D'après Hawkey *et al.* (125).



D.Trystram - V.jarlier - 25 mai 2011 - BMR-AP-HP Collégiale de BVH

Figure 14: Evolution de 1995 à 2010 de la distribution relative (%) des EBLSE selon l'espèce dans les hôpitaux de l'AP-HP.

Différent réseaux permettent de suivre les tendances des résistances en Europe (EARSS qui regroupe 800 laboratoires dans 31 pays) et dans le monde (*TEST pour Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*, multicentrique regroupant 266 centres repartis sur 4 continents (225). Ils indiquent des variations très importantes selon les pays (prévalence de 0% - 80%). Ainsi, dans les pays scandinaves, la prévalence reste inférieure à 5% en 2010 (figure 15). En revanche, les pays de l'Est sont très touchés : *K. pneumoniae* y est l'espèce prédominante. En Hongrie, 2/3 des isolats de *K. pneumoniae* BLSE appartiennent à 3 clones producteurs de CTX-M-15 (ST11, ST15 et ST147) ; le ST15 est connu sous le terme HEC pour *Hungarian Epidemic Clone* (77). D'autres pays proches sont dans une situation comparable telles la République Tchèque (128) et la Roumanie (90). Au sud, l'épidémiologie des BLSE en Espagne est un peu différente avec une prévalence élevée de CTX-M du groupe 9 et 14 (35,36).

Les données de TEST recueillies de janvier 2004 à août 2006 (4916 isolats) en Asie, en Europe, en Amérique du Nord et en Amérique Latine indiquent que la prévalence des KpBLSE était plus élevée en Amérique Latine (44%) et en Asie (22,4%) qu'en Europe (13.3%) ou en Amérique du Nord (7.5%) (227). En Europe, la Grèce était le pays où la prévalence de *K. pneumoniae* BLSE était la plus élevée (44%) alors qu'aucune souche n'était rapportée au Danemark, en Finlande, en Suisse, en Autriche, en Irlande, en République Tchèque et en Hollande. En Amérique Latine, des épidémies à KpBLSE (CTX-M-1 ou CTX-M-2) ont été décrites (83). En Asie, la place des CTX-M semble largement prédominante chez *K. pneumoniae* (156). En revanche, en Amérique du Nord, les enzymes de type SHV, notamment SHV-5 restent les plus fréquentes et, parfois encore à l'origine d'épidémies. Ainsi, les BLSE de type SHV (SHV-2, -2a, -5 et -12) semblent persister sur tous les continents, notamment en Europe (36).

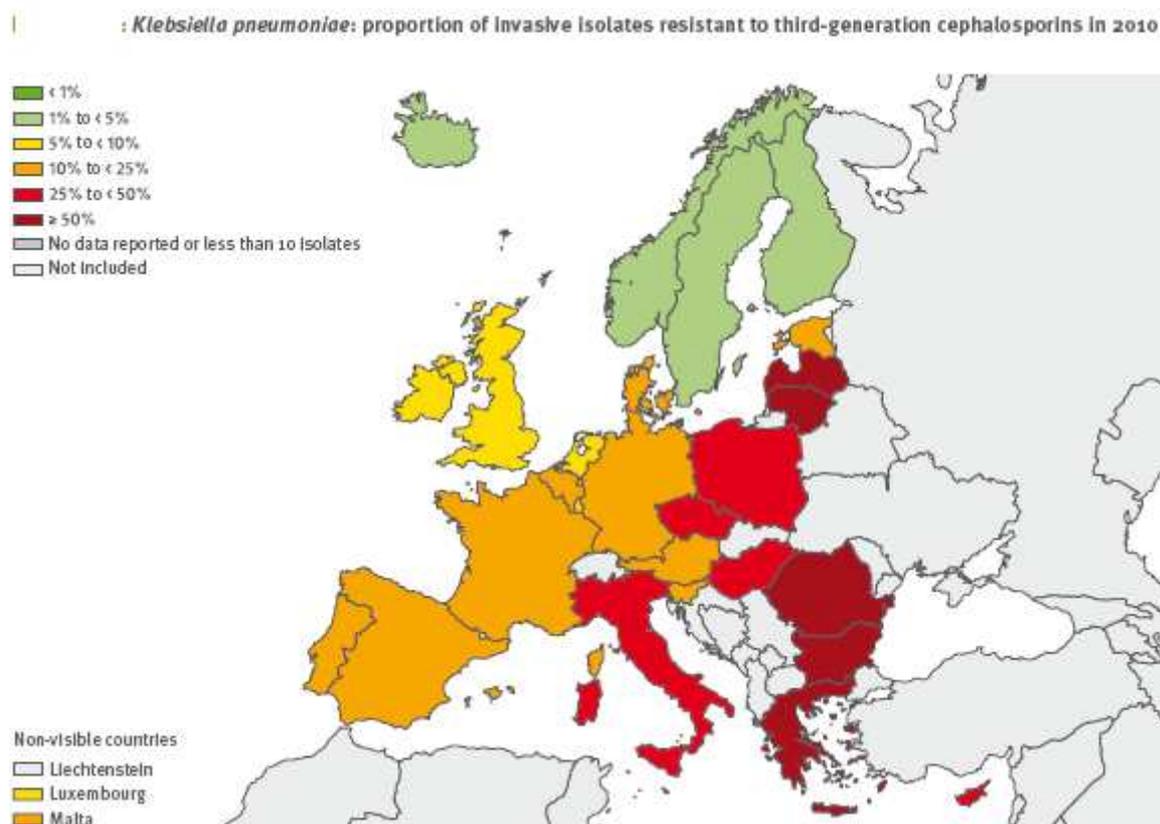


Figure 15: Répartition des souches invasives de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération en Europe en 2010 EARSS (90).

Enfin, les BLSE plus rares, comme PER ou VEB, ont des répartitions géographiques différentes. Ainsi l'enzyme VEB-1 est très répandue dans le sud-est asiatique alors que PER-1 est prépondérante en Turquie et PER-2 n'a été décrite qu'en Argentine (222). Enfin l'enzyme TLA-1 n'a été observée qu'au Mexique (176). En France, les enzymes PER-1 ou GES-1 sont observées de façon sporadique ou sont associées à des épidémies comme VEB-1 chez *A. baumannii* (175).

c- Les céphalosporinases acquises

Les céphalosporinases (Cases), β -lactamases de la classe C, correspondaient jusqu'à une période récente à des enzymes chromosomiques, spécifiques d'espèce. Pour certaines, les gènes sont d'identification récente telles *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Aeromonas caviae*, *Acinetobacter baumannii*, *Ochrobactrum anthropi* ou *Shewanella putrefaciens*. Ce type d'enzyme lors d'hyperproduction (mutation d'un gène du métabolisme du peptidoglycane, *ampD*) conduit à un phénotype de résistance plus étendu ou large que celui d'une BLSE. Car, outre la résistance aux C3G, émerge celle vis-à-vis des céphamycines (céfoxitine, céfotétan) et celle aux associations avec les inhibiteurs tel l'acide clavulanique. Ce n'est que vers 1988, que sont apparues aux Etats-Unis et en Europe, les premières souches cliniques de *Klebsiella* sp. (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*) présentant un phénotype de résistance de type céphalosporinase alors qu'elles n'en produisent pas naturellement (193, 203). La découverte de "Cases plasmidiques" originaires d'entérobactéries naturellement productrices, a été une nouvelle étape de la résistance acquise aux antibiotiques (C3G en particulier) par mobilisation de gènes chromosomiques (203). Le phénotype de résistance observé est similaire à celui d'une Case chromosomique hyperproduite avec, généralement, une résistance aux C3G et aux associations avec les inhibiteurs (202, 203). A l'exception de celles productrices de l'enzyme ACC-1, la majorité des souches productrices est résistante à la céfoxitine. Pour plusieurs de ces

enzymes transférables, les progéniteurs ont été identifiés : groupe CMY (*Citrobacter freundii*), DHA-1 (*Morganella morganii*), groupe FOX (*Aeromonas caviae*), ACT-1 (*Enterobacter asburiae*) et ACC-1 (*Hafnia alvei*). Cette émergence a été observée dans divers pays ou continents chez diverses espèces d'entérobactéries parmi lesquelles *E. coli* et *K. pneumoniae* sont les plus représentées ainsi que *Salmonella enterica* ou *Proteus mirabilis* (203, 179).

d- Les carbapénémases

Avec l'augmentation de la prévalence des EBLSE dont les KpBLSE dans les hôpitaux, les carbapénèmes sont devenus les antibiotiques de choix pour traiter les infections liées à ces souches. Aussi, il n'est pas surprenant que la pression de sélection ait été à l'origine de l'émergence de souches résistantes à ces molécules.

Initialement, chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes était liée à l'association de la production de Case (naturelle ou acquise) ou de BLSE avec une diminution de perméabilité. S'y est ajoutée depuis quelques années l'apparition de nouvelles enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes. Ces dernières ont émergé dans 3 des 4 classes moléculaires de Ambler : la classe A comprend notamment les enzymes de type KPC, la classe B, les métallo- β -lactamases comme VIM ou plus récemment NDM-1 et enfin la classe D comprend des enzymes comme OXA-48. On constate une augmentation constante du nombre de cas signalés en Europe (115) (Figure 16).

Klebsiella pneumoniae: proportion of Invasive Isolates resistant to carbapenems in 2010



Figure 16: Répartition des souches de *K.pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes en Europe en 2010 EARSS (90).

En France, les carbapénémases font l'objet d'une surveillance étroite. Des recommandations pour la prise en charge de patients transférés de l'étranger ont été diffusées. L'InVS recueille les données et publie régulièrement un état des lieux des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC). Le nombre d'épisodes impliquant des EPC reste encore limité en France, 104 entre 2004 et 2011 (www.invs.sante.fr, 261) (figure 17), en comparaison à d'autres pays. Cependant, si des biais de signalement ne peuvent être exclus, les tendances récentes confirment une nette progression des épisodes sur les deux dernières années. Les bactéries les plus fréquemment en cause sont *K. pneumoniae* et *E. coli*. Les mécanismes de résistance OXA-48 (51%) et KPC (25%) sont les plus fréquemment retrouvés. Les carbapénémases de type NDM-1 ne représentent à ce jour que 13 % des épisodes impliquant des EPC signalés en France. Les signalements correspondent très majoritairement à des cas sporadiques importés de l'étranger dans un contexte de transfert direct

d'hôpital à hôpital suite à un rapatriement sanitaire (66%). Le nombre d'épisodes associés à des antécédents d'hospitalisation à l'étranger plus lointains, voire à des séjours à l'étranger sans hospitalisation, est beaucoup plus faible (www.invs.sante.fr, 261).

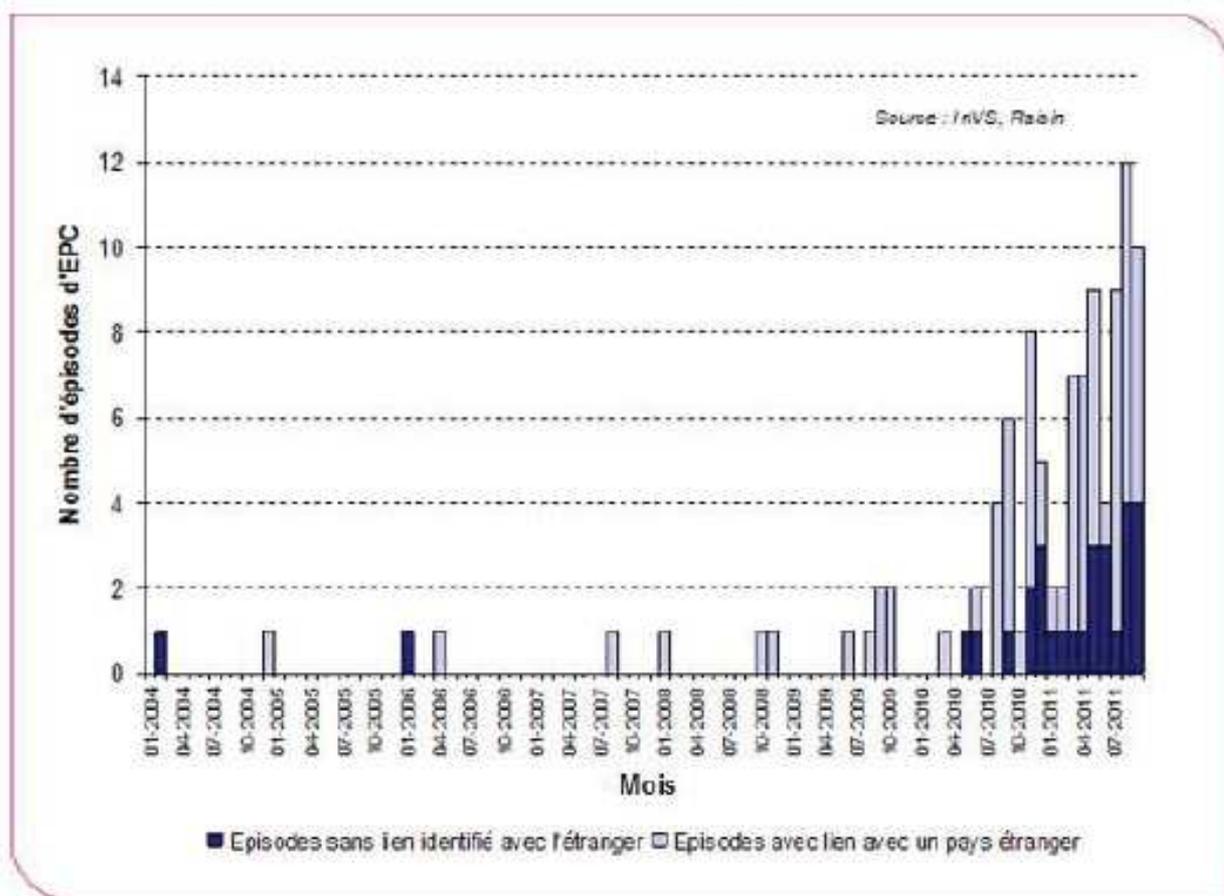


Figure17: Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France signalés à l'InVS entre 2004 et 2011, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger : bilan du 27 septembre 2011 (N=104) (www.invs.sante.fr).

- **Carbapénémases de classe A**

Ce sont des enzymes partiellement inhibées par l'acide clavulanique. Les premières sont issues de gènes chromosomiques ou de gènes plasmidiques (SME, NMC-A, IMI et SFC-1) et concernaient des entérobactéries comme *Serratia* ou *Enterobacter*. Plus tard, quelques variants des β -lactamases de type GES (GES-4, -5 et -6) hydrolysant faiblement les carbapénèmes ont été caractérisés chez *K. pneumoniae* et *E. coli* (221, 211). Plus inquiétantes et avec un pouvoir de dissémination

bien supérieur, sont apparues les enzymes de type KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*) (71). La description initiale correspond à une souche de *K. pneumoniae* résistante à toutes les β -lactamines isolée en Caroline du Nord en 1996, productrice de KPC-1 (=KPC-2) (282). Depuis d'autres variants ont été décrits (KPC-3 à -8) (184).

Après la première description de KPC-1/2, l'incidence des souches de *K. pneumoniae* productrices de cette enzyme a augmenté régulièrement dans la région de New-York (25, 26, 161). En 2004 dans les hôpitaux de Brooklyn, New-York, aucune souche de *E. coli* ou de *E. cloacae* ne possédaient le gène *bla*_{-KPC}, alors que 24 % des souches de *K. pneumoniae* étaient KPC positives (24). Actuellement, 38 % des souches de *K. pneumoniae* identifiées dans les hôpitaux de New-York portent le gène *bla*_{-KPC} (148). Un complexe clonal majeur (ST258) semble disséminer aux États-Unis (27). L'enzyme KPC a également été détectée chez quelques autres espèces d'entérobactéries (*E. coli*, *Salmonella*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *K. oxytoca*) (201, 252, 283) ainsi que dans des souches de *Pseudomonas* spp. (276). Des souches de *K. pneumoniae* productrices de KPC-3 ont récemment été rapportées dans un hôpital d'Ottawa, Canada (110).

L'Amérique du Sud connaît également une importante dissémination de KPC. Les premières souches de *K. pneumoniae* KPC-2 ont été décrites en 2006, en Colombie, suivies en 2007 par les premières souches de *P. aeruginosa* (266,267). D'autres pays (Brésil, Argentine) ont également rapporté la présence de souches de *K. pneumoniae* productrices de KPC dans leurs hôpitaux (196, 194). La première épidémie de *K. pneumoniae* productrice de KPC décrite en dehors des États-Unis, a été identifiée en Israël. Un clone de *K. pneumoniae* KPC-3 et plusieurs clones KPC-2 sont actuellement responsables d'épidémies dans les hôpitaux de Tel Aviv (151). Des souches de *E. coli* et de *E. cloacae* ont aussi été rapportées (182). Le lien génétique entre des souches KPC-3 isolées aux États-Unis et des souches isolées en Israël, soulignant le rôle des transferts de patients et des voyageurs entre pays, a été démontré (183). En Chine, les

souches productrices de KPC sont de plus en plus souvent rapportées (34), notamment dans des espèces qui n'étaient pas encore concernées comme *C. freundii* ou *S. marcescens* (34, 194, 290). L'impact réel de telles souches dans ce pays n'est pas connu. En Europe, les cas décrits restent rares, souvent sporadiques et importés. En France, 27 épisodes impliquant des souches KPC ont actuellement été signalées en France depuis 2004 (www.invs.sante.fr). La première *K. pneumoniae* KPC-2 date de 2005 et a été isolée chez un patient ayant séjourné dans un hôpital new-yorkais (174). Depuis, d'autres souches isolées de patients transférés des USA, d'Israël et de Grèce ont été rapportés (69, 89, 140). De même, la première souche de *K. pneumoniae* KPC-2 isolée en Suède provenait d'un patient ayant séjourné en Grèce (250), seul pays européen où des épidémies, toujours dues à *K. pneumoniae* KPC-2, ont été décrites et où la situation est endémique (219). Enfin, plusieurs souches ont été décrites au Royaume-Uni (*Enterobacter* spp. KPC-4 et *K. pneumoniae* KPC-3) (278). Pour certaines de ces souches, un lien direct avec Israël a pu être établi.

- **Carbapénémases de classe B**

Les métallo- β -lactamases (MBL) sont essentiellement des enzymes de type IMP (IMiPéménase) ou VIM (Verona IMipéménase) responsables d'épidémies hospitalières sévères dans certains pays, particulièrement en Asie et en Europe du Sud (221, 268, 260, 163) et plus récemment en France (139). Ces MBL possèdent des ions zinc dans leur site actif et hydrolysent fortement les toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztreonam. Leur activité est inhibée par l'EDTA. Les enzymes IMP ont été initialement décrites chez des espèces typiquement hospitalières (*Serratia*, *Citrobacter* et *Enterobacter*) au Japon (221, 268). Les enzymes de type VIM qui ont émergé chez *P. aeruginosa* puis chez *Acinetobacter baumannii* sont maintenant très répandues chez les entérobactéries dans le monde entier, notamment chez *K. pneumoniae*. En Grèce, la proportion de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes a

considérablement augmenté : de <1% en 2002 à 20% dans les unités classiques et 50% dans les unités de soins intensifs en 2006, due essentiellement à la dissémination de souches productrices de VIM-1 (260).

NDM-1, *New Delhi metallo-β-lactamase 1*, identifiée en 2008, est une nouvelle zinc-metallo-β-lactamase identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* et dans une souche d'*E. coli* provenant respectivement d'un prélèvement urinaire et rectal chez un patient suédois rapatrié après un séjour dans un hôpital de New Delhi. Des épidémies ont été décrites en particulier en Angleterre (247). Dans tous les cas les patients avaient un antécédent de voyage en Inde ou au Pakistan et parmi eux, certains avaient été hospitalisés (147). Parmi les entérobactéries, *E. coli* et *K. pneumoniae* étaient les espèces les plus fréquentes mais NDM-1 a été retrouvé également chez *K. oxytoca*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *M. morgani*, *Proteus* sp. et *Providencia* sp. (286, 147). Différentes observations suggèrent que cette enzyme aurait déjà une diffusion internationale avec des cas rapportés dans le monde entier en Amérique du Sud et Centrale (185). Des données récentes suggèrent que les Balkans et le Moyen Orient constitueraient un réservoir secondaire dans la dissémination de NDM-1 dont le rapport avec l'Inde n'est pas établi (186, 162). En Inde et au Pakistan, les entérobactéries productrices de NDM-1 sont responsables d'infections nosocomiales mais également communautaires et Walsh *et al.* ont montré la présence de NDM-1 chez des bacilles à Gram négatifs (dont des entérobactéries et essentiellement *Shigella* sp) dans des prélèvements d'eaux usées et d'eau du robinet à New-Delhi (270).

- **Carbapénémases de classe D**

L'enzyme OXA-48, initialement décrite dans une souche de *K. pneumoniae* isolée en Turquie (209) hydrolyse faiblement les pénicillines et carbapénèmes mais pas les C3G. Cette particularité la rend difficile à détecter en l'absence d'un autre mécanisme de résistance aux β-

lactamines associé. Elle peut-être associée à une BLSE, en particulier CTX-M-15 et SHV-12, rendant les souches résistantes à toutes les β -lactamines (216, 217). L'origine du gène codant OXA-48 a été identifiée : il s'agit de *Shewanella* sp., ce qui suggère la mobilisation du gène en milieu aqueux (217). OXA-48 a largement diffusé dans de nombreux hôpitaux des pays du pourtour méditerranéen (Turquie, Liban, Israël, Egypte, Maroc, Tunisie) et en Argentine (214, 215, 72). Des épidémies ont été rapportées, notamment en Turquie (47), en Tunisie (173), au Maroc (289) et au Liban (169, 138). Des données récentes suggèrent que cette carbapénémase diffuse largement en Europe (www.ecdc.europa.eu, 115, 70, 73).

e- Multiresistance des souches de *K. pneumoniae*

La résistance simultanée à plusieurs familles d'antibiotiques (multirésistance) est fréquente chez *K. pneumoniae*. Les données de la surveillance EARSS en 2007 indiquaient que plus de 97% des souches de *K. pneumoniae* BLSE isolées d'hémocultures sont également résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones.

Initialement la résistance aux fluoroquinolones était secondaire à des mutations présentes dans les gènes chromosomiques *gyrA* et *parC* codant respectivement les gyrases et les topoisomérases bactériennes ou à un défaut d'accumulation par imperméabilité. Ces mécanismes ont été fréquemment observés chez les souches de *K. pneumoniae* BLSE. Plus récemment, d'autres mécanismes transférables sont apparus. Ainsi la résistance aux fluoroquinolones peut être due aux protéines Qnr protectrices qui s'interposent entre l'antibiotique et la cible. Différents gènes ont été décrits (*qnrA*, B, S) ; ils sont fréquemment associés à différents types de gènes de résistance (54). La résistance aux quinolones peut également être due à l'enzyme AAC(6')-Ib-cr, responsable d'une résistance associée aux aminosides et aux fluoroquinolones par acétylation de ces antibiotiques.

La résistance aux aminosides est essentiellement liée à la production d'enzymes inactivatrices. Les gènes codant ces enzymes sont présents sur les plasmides portant une variété importante de gènes *bla*. Certaines enzymes sont souvent associées aux BLSE comme AAC(6')-Ib ou de son dérivé AAC(6')-Ib-cr. La résistance simultanée à la gentamicine et à l'amikacine peut être liée à la production de plusieurs enzymes ou, aux méthylases ArmA et ArmB. Ces dernières, identifiées dans les années 2000 entraînent la méthylation du site d'action des aminosides, la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal bactérien. La prévalence de ces enzymes est très élevée en Asie chez les souches de *K. pneumoniae* productrices de CTX-M-15 (158, 166).

L'apparition et la fréquence croissante de souches sécrétrices de plusieurs β -lactamases constituent un autre phénomène inquiétant. Ainsi, l'enzyme CTX-M-15 est souvent associée à des pénicillinases TEM-1 et/ou OXA-1 (168, 65)

Le plus souvent, les souches qui produisent KPC expriment également d'autres bêta-lactamases, dont de nombreux types de BLSE (TEM, SHV, CTX-M), et possèdent un certain degré de résistance par imperméabilité (20, 140, 184). Il est de même pour les souches productrices de métallobêta-lactamases (139, 185) ou d'oxacillinase OXA-48 (80, 73, 116). Des souches de *K. pneumoniae* associant deux carbapénémases (VIM et KPC) ont récemment été décrites en Grèce et en Tunisie, associées à d'autres β -lactamases (CMY-2, CTX-M-15) (108, 218).

V- Supports génétiques de la résistance

Les bacilles à Gram négatif, en particulier les entérobactéries, sont particulièrement efficaces pour échanger de l'information génétique et, la résistance aux antibiotiques de ces espèces est souvent due à l'acquisition de gènes étrangers. Ces gènes ont été capturés à partir du chromosome d'espèces différentes. Ces mobilisations impliquent deux types différents d'éléments génétiques mobiles. Ceux qui sont capables de transférer ou de capter des gènes entre les molécules d'ADN tels que les séquences

d'insertion, les transposons, ou les cassettes des intégrons, et, ceux qui permettent de transfert d'ADN entre cellules, tels que les plasmides conjugatifs et mobilisables ou les éléments intégratifs conjugatifs (ICE).

1-Place des plasmides

a. Généralités

Les plasmides sont des agents essentiels pour le flux horizontal de gènes et donc une composante importante de l'évolution bactérienne. Ce sont des ADN circulaires extra-chromosomiques capables d'auto-réplication (réplicon) et parfois de transfert. Ils possèdent une origine de réplication (*ori*) qui les divise en classes d'incompatibilité (groupe Inc) : en principe 2 plasmides du même groupe Inc ne peuvent pas se répliquer et se ségréguer correctement dans les cellules filles.

Les plasmides codent également pour des fonctions conférant un avantage à la cellule hôte (résistance aux antibiotiques, facteurs de virulence, toxines, nouvelle voie métabolique, etc.). On a décrit sur certains plasmides essentiellement des facteurs contribuant directement à la pathogénicité (système de transport du fer, adhérence, cytotoxines, invasives ...) comme les plasmides de virulence de *Salmonella* sp. et de *Shigella* sp. (251). Une autre de leurs grandes caractéristiques est leur capacité à porter et à transmettre les gènes codant pour la résistance aux antimicrobiens. Ces derniers, appelés plasmides R, abritent une variété de gènes conduisant à un spectre de résistance large. L'analyse génétique et moléculaire des plasmides bactériens a fourni des informations essentielles sur la conjugaison de l'ADN, le contrôle de l'expression, le transfert et la recombinaison de gènes. Elle s'est avérée également essentielle dans la compréhension (i) de la structure de certains éléments génétiques mobiles comme les transposons, ou immobiles comme les intégrons et (ii) de leur rôle dans la transmission de la résistance bactérienne. Les données disponibles indiquent que dans les bactéries à Gram négatif, en particulier les entérobactéries, les gènes de résistance et

les éléments mobiles portés par des plasmides sont souvent regroupés dans une même région, « *large multiresistance regions* » (MRR).

b. Plasmide : réplication et contrôle

La réplication de l'ADN plasmidique est couplée au cycle cellulaire de la bactérie hôte. Le nombre de copies d'un plasmide varie de 1 à quelques dizaines par bactérie, souvent en relation avec leur taille ; le nombre de copies est une caractéristique constante d'un plasmide donné, dans des conditions données. Le contrôle de la réplication est codé par le plasmide lui-même. Ce contrôle est réalisé par des molécules (ARN antisens, des protéines ou des séquences d'ADN) qui régulent l'initiation de la réplication de façon dose-dépendante. Le contrôle de la réplication du plasmide peut être exercée (i) par un inhibiteur unique, (ii) par un élément principal et un élément auxiliaire, ou (iii) par l'action concertée de deux inhibiteurs (une protéine et un ARN antisens ou deux jeux d'itérons) (2, 84, 98, 104)).

c. Plasmide : nombre de copies, incompatibilité, et classification.

Pour définir et maintenir le nombre de copies, les plasmides utilisent un système de régulation négatif. Le contrôle de la réplication par une régulation négative et la sélection aléatoire des plasmides de réplication ont une conséquence supplémentaire: en l'absence de pression de sélection, deux plasmides avec des réplicons identiques sont incapables de coexister de façon stable dans une cellule donnée. Cela conduit à la séparation des plasmides au sein des descendants. Ce phénomène est connu sous le nom d'incompatibilité (Inc) (187). La classification des plasmides basée sur leur incompatibilité est très laborieuse. La première méthode génétique analysait la capacité de deux plasmides à persister au sein du même individu. La deuxième méthode de typage, moléculaire, a été initialement basée sur l'hybridation (67) puis a été remplacée récemment par une méthode utilisant la PCR (38, 102, 265) nommée *Replicon typing method* (PRTM). Vingt-sept groupes ont été définis chez

les entérobactéries, incluant 6 IncF (FII à FVII), 3 variants de IncI (39, 40, 265). Cette méthode ne permet pas de typer tous les plasmides, en particulier pour les plasmides mosaïques ayant plusieurs origines de réplication. Ceci rend la classification des plasmides de plus en plus difficile. Malgré ces inconvénients, la PRTM est souvent utilisée comme un marqueur supplémentaire dans les études épidémiologiques comparant des souches. Une méthode récente de classification a été proposée ; elle est basée sur la conjugaison en utilisant comme marqueur, une relaxase (MOB) appartenant au système de sécrétion de type IV impliqué dans la mobilité plasmidique (104).

Certains plasmides sont à large spectre d'hôte (IncP, IncQ, IncA/C, IncL/M) alors que d'autres sont à spectre plus étroit, pouvant avoir même une spécificité d'hôte (plasmides du groupe IncF). Ce qui détermine le spectre de l'hôte n'a pas été clairement élucidé. Une des possibilités serait la spécificité plus ou moins grande des récepteurs de surface nécessaires à la conjugaison chez la cellule receveuse (19). L'autre possibilité serait que la machinerie de la réplication puisse fonctionner, soit dans des hôtes très différents ou au contraire dans un groupe restreint de bactéries comme *E. coli* ou *Salmonella*.

d. Plasmide : fonctions de maintien

Pour les plasmides à nombre de copies élevées, la pérennisation des plasmides est assurée par une diffusion passive. En revanche pour les plasmides à faible nombre de copies, l'étape de ségrégation de l'ADN (ou partition) est essentielle pour assurer une transmission stable aux deux cellules filles. Trois modules ou systèmes sont nécessaires pour prévenir la perte du plasmide lors de la division cellulaire et assurer la pérennité de la transmission plasmidique:

- La résolution de multimères (98).

Lors de la ségrégation de l'ADN, il est important que les multimères soient séparés en monomères juste avant la division cellulaire. Un système

d'enzyme de recombinaison spécifique de site assure cette ségrégation. Les grands plasmides codent pour leurs propres recombinases.

- Les systèmes de partition.

Les fonctions de réplication et de ségrégation sont indépendantes. Les systèmes de partition assurent la répartition de l'ADN plasmidique aux 2 pôles de la cellule avant la division cellulaire. Les plasmides à faibles copies semblent coder pour un système de partition (*par*) (236, 239). Les systèmes de partition sont classés en 3 groupes (I, II, III) et 2 sous groupes (IA, IB).

- Les systèmes toxine-antitoxine (TA) ou systèmes d'addiction.

Les systèmes TA sont des structures génétiques de petite taille retrouvées sur des éléments génétiques mobiles ou sur le chromosome bactérien (122, 259). Le système TA est formé de deux gènes organisés en opéron. Le premier code codant pour une antitoxine et le second pour la toxine. Il y a donc, quand le plasmide est présent, autant de toxine que d'antitoxine (qui neutralise la toxine). Après la division cellulaire, si un variant perd le plasmide, l'antitoxine encore présente (mais non renouvelée) et qui est instable, est dégradée par une protéase et la toxine stable interagit avec sa cible chez ce variant entraînant sa mort cellulaire (figure 18). Les cibles des toxines sont, soit la membrane cellulaire, soit des enzymes impliquées dans la machinerie de la division cellulaire (246). Les systèmes TA sont séparés en 4 familles de gènes en fonction de leur séquence et de leur structure *relE/parE*, *mazF/kid/ccd*, *vapC* et *doc* (157). Ces TA se retrouvent aussi bien dans les plasmides de virulence ou portant des gènes de résistance aux antibiotiques, en particulier, dans les plasmides à faible nombre de copies.

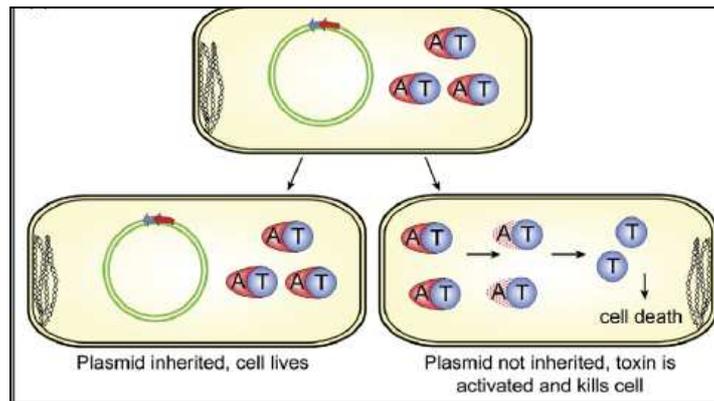


Figure 18 : Plasmide codant pour un système toxine-antitoxine: élimination de la bactérie ne possédant pas de plasmide. D'après Smillie *et al.* (246).

Il existe un autre système

- Le système de modification-restriction (RM) : Ce système est retrouvé dans le chromosome ou sur des éléments mobiles (plasmides, transposons) (226). Ce système code des enzymes spécifiques de site impliquées dans le maintien des plasmides.

e. Plasmide : mobilité

Le transfert par conjugaison et transposition d'ADN est essentiel à la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Le système de conjugaison a 3 composants principaux : (i) le transférosome (système de sécrétion de type IV ou T4SS) situé au niveau de la membrane cellulaire et impliqué dans la synthèse des pili conjugatifs, (ii) le relaxosome, complexe protéique, qui coupe l'ADN au niveau de son origine de transfert (*orit*), (iii) les protéines de couplage qui relie les 2 entités entre elles.

Pendant la conjugaison, seul un brin d'ADN appelé le brin de transfert (T), est transféré de la bactérie donneuse à la receveuse. Le brin T est clivé par une nucléase au niveau site nic de l'*oriT*. Une relaxase va ensuite établir une liaison covalente avec le brin T pour créer un produit intermédiaire protéine-DNA (200). Une fois le contact établi entre cellule donneuse et receveuse, le complexe nucléoprotéique est transféré dans la cellule receveuse grâce aux pili (T4SS). Le DNA est ensuite activement pompé par la protéine de couplage de type IV (T4CP) (58).

Les relaxases sont classées en 6 familles MOB (MOB_F, H, Q, C, P et V) (104, 246).

Le système de sécrétion de type IV (T4SS) est impliqué dans le transfert horizontal de gènes et la dissémination des gènes de résistance et de virulence. Malgré une grande diversité de leur substrat, tous les T4SS sont reliés et mais ont plusieurs dénominations, Vir, Tra, TrW ... (120). Le système le mieux caractérisé est celui d'*Agrobacterium tumefaciens* ; Il comprend 12 protéines (VirB1 à VirB11 et VirD4) (figure 19). Les plasmides conjugatifs (ou autotransférables) possèdent un gène *Mob* (relaxase) et un système de sécrétion alors que les plasmides dits mobilisable mais non conjugatifs n'en possèdent pas (figure 20).

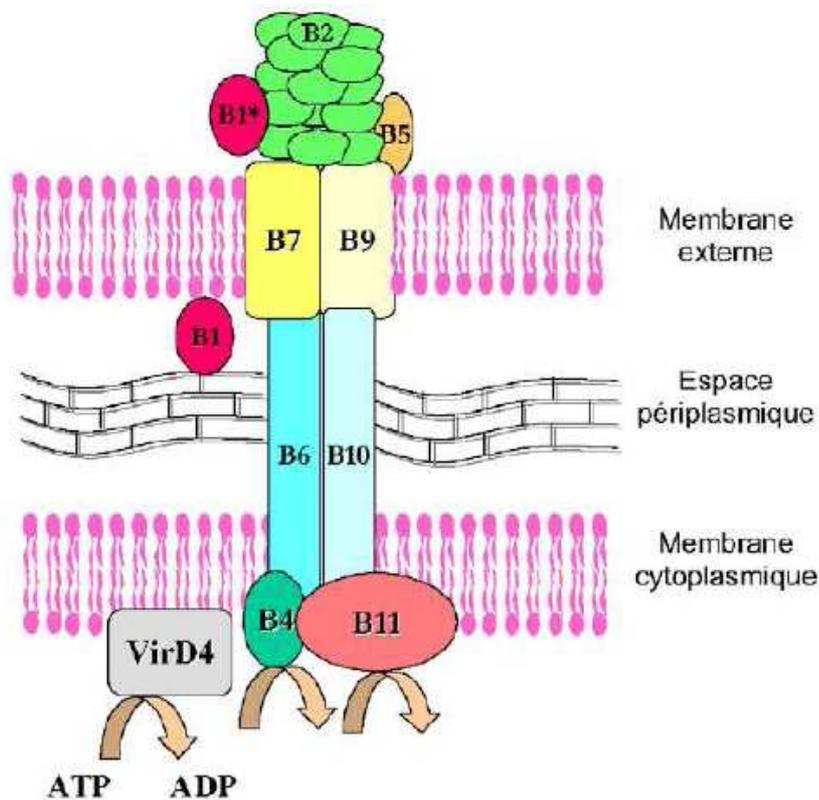


Figure 19 : Représentation schématique de la structure des systèmes de sécrétion de type IV. L'association des composants VirB chez *Agrobacterium tumefaciens*. Les protéines VirB et VirD4 sont regroupées selon leur fonction probable : les protéines exocellulaires impliquées dans l'attachement à la cellule receveuse (VirB1*, VirB2 et VirB5), les protéines formant le pore (VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 et VirB10) et les ATPases de la membrane cytoplasmique (VirB4, VirB11 et VirD4). D'après Lavigne *et al* (149).

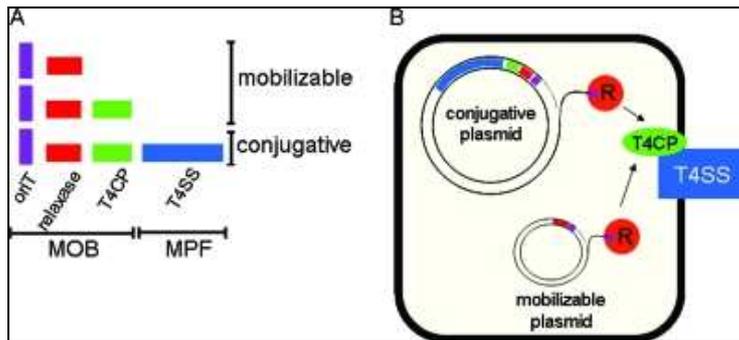


Figure 20 : constitution génétique des plasmides conjugatifs et mobilisables. T4CP : protéine de couplage, T4SS : système de sécrétion de type IV. D'après Smillie *et al.* (246).

2- Les séquences d'insertion sont la forme la plus simple d'un élément transposable (figure 21). Ils sont composés uniquement d'un gène de transposase (*tnpA*) bordé de part et d'autre d'une séquence inversée répétée, IR_L et IR_R (« left » et right »). Les séquences IRs , servent de signaux de reconnaissance puis de sites de coupure à la transposase. Les séquences d'insertion sont très impliquées dans le recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques. Parmi les IS associées aux résistances aux antibiotiques, on trouve :

- l'*IS1* associée au gène *catA1* codant pour une acétyltransférase (résistance au chloramphénicol),
- l'*IS10* associée au gène *tetA* codant pour la résistance à la tétracycline,
- l'*IS26* associée aux gènes *aphA1*, *npmA* codant pour des méthylases (résistance aux aminosides), *bla_{SHV}* codant pour une β -lactamases de type SHV (classe A), gène *tetA* et *catA2*, *bla_{CMY}* codant pour une β -lactamase de type céphalosporinase (classe C),
- *IS903* associée au gène *aphA1* codant pour une phosphotransférase (résistance aux aminosides),
- *ISAbal* associée au gène *bla_{OXA-23}* codant pour une β -lactamase de type oxacillinase (classe D), *ISEcp1* associée (i) aux gènes *bla_{CTX-M}* codant pour β -lactamases de type

céfotaximase (classeA), (ii) au gène *bla*_{CMY-2} et *bla*_{ACC-1} codant pour des β-lactamases de type céphalosporinase (classe C), (iii) au gène *rmtC* codant pour des méthylases (résistance aux aminosides), (iv) au gène *qnrB* codant pour la résistance aux quinolones.

3- Les éléments transposables forment une classe très hétérogène d'éléments génétiques pouvant s'insérer par transposition à divers endroits sur un chromosome ou un plasmide (figure 21). Les transposons (Tn) sont des éléments transposables qui sont plus grands que les IS. Ces éléments varient autant dans leurs mécanismes de transposition, leurs structures et leurs choix des séquences cibles pour l'insertion. Chez les procaryotes, certains éléments transposables se sont associés à des gènes conférant un avantage sélectif afin de favoriser leur propagation dans les génomes et les plasmides. Ces éléments mobiles portent les gènes codant pour les fonctions de transposition qui sont généralement associés à des gènes supplémentaires qui peuvent être des gènes de résistance aux antibiotiques. Ils prennent ainsi toute leur importance dans le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Certains transposons de résistance portent un seul gène de résistance comme Tn3, alors que d'autres portent les gènes codant une voie métabolique complète permettant de contourner l'effet d'un antibiotique comme la vancomycine dans le cas de Tn1546. Lorsque deux copies d'une même séquence d'insertion bordent une région d'ADN, il est possible que la transposase reconnaisse les extrémités IR externes de chaque IS et mobilise la région en entier lors d'un événement de transposition. Cette structure porte le nom de transposon composite. C'est principalement de cette façon que les IS arrivent à mobiliser et réorganiser des gènes codant des facteurs accessoires, comme la résistance aux antibiotiques. La littérature scientifique est très riche d'exemples de l'implication des transposons composites dans l'évolution et l'adaptation bactérienne.

Ces transposons sont fréquemment rencontrés chez des plasmides conjugatifs, qui sont eux-mêmes souvent réorganisés par les mouvements des transposons.

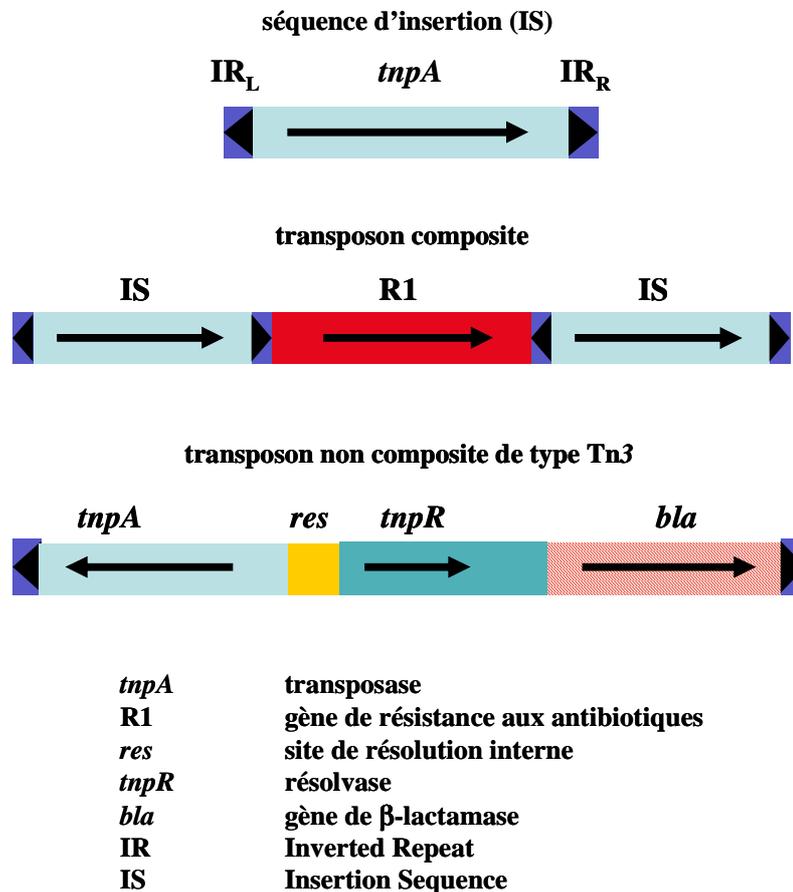


Figure 21: Exemples de séquences d'insertions, transposons composites, transposons de type Tn3.

Par ailleurs, ils peuvent contenir des promoteurs dont certains dirigent l'expression vers l'extérieur du transposon, d'un gène adjacent. Ils peuvent également générer des délétions et des inversions des séquences adjacentes, et même activer la transcription de gènes.

4- Les intégrons (figures 22 et 23) sont des systèmes de recombinaison spécifiques de site permettant de réorganiser des gènes sous forme de cassettes mobilisables par l'action d'une intégrase. Depuis leur découverte dans les années 1980, ils se sont avérés être les vecteurs d'expression naturels les plus complexes concernant la réorganisation des gènes de

résistance aux antibiotiques. Les intégrons peuvent jouer un rôle dans l'évolution rapide des bactéries en acquérant et exprimant rapidement de nouveaux gènes provenant d'autres bactéries. Ces structures sont retrouvées dans les plasmides et les chromosomes des bactéries à Gram-négatif, tout particulièrement chez les *Enterobacteriaceae*. De façon générale, les intégrons sont composés de 3 éléments distincts : un gène qui code une intégrase (*intI*) de la famille des tyrosines recombinases chargée d'exciser et d'intégrer les cassettes, un site spécifique nommé *attI* où l'intégrase va intégrer préférentiellement les cassettes, puis un promoteur facilitant l'expression des cassettes. Les cassettes elles-mêmes contiennent un autre élément de recombinaison nommé *attC* qui est aussi reconnu par l'intégrase. Il existe une grande variété chez les intégrons, notamment par rapport à la diversité des gènes d'intégrase, des sites *attC* et du nombre de cassettes qu'ils contiennent. On classe généralement les intégrons selon leur gène d'intégrase. Les classes 1, 2 et 3 contiennent généralement des intégrons de résistance plasmidique.

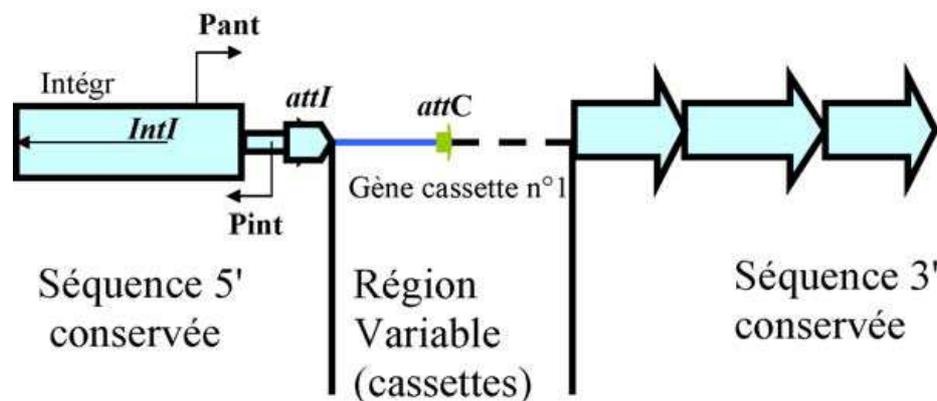


Figure 22: Représentation schématique d'un intégron. Les régions de l'intégron sont délimitées par les traits noirs verticaux. Au sein de la partie 5' conservée, le grand rectangle contient le gène *intI*, orienté selon la flèche noire et le triangle représente l'*attI* (site d'intégration). Au niveau de la région variable un gène cassette est représenté. Le trait bleu représente le gène, codant plus souvent une résistance aux antibiotiques et la flèche verte représente l'*attC* (« core site »). La ligne pointillée représente l'emplacement d'éventuelles autres cassettes. Les flèches bleues de la séquence conservée représentent les éventuels segments de la partie 3' conservée. Pant est le promoteur d'éventuelles cassettes, Pint est le promoteur du gène *intI*.

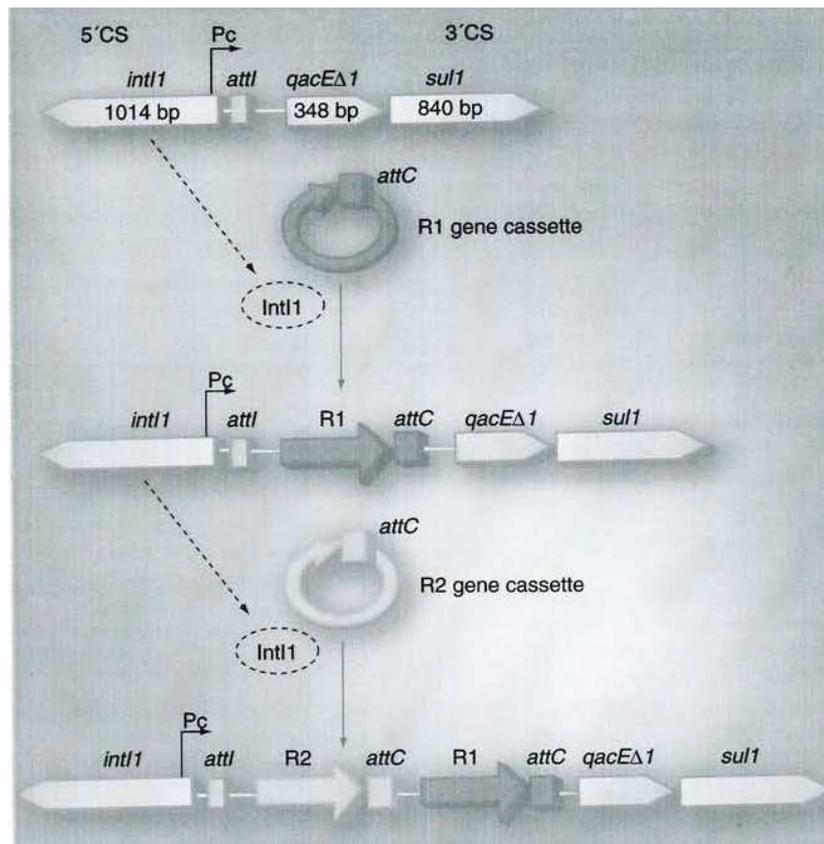


Figure 23: Intégron de classe 1 et capture de gènes cassettes. D'après Zhao et al. (291).

Les gènes de résistance R1 et R2 sont insérés successivement au niveau du site spécifique d'attachement (*attI*) de l'intégron. Le gène de l'intégrase (*intI*), le promoteur du gène de l'*attI* se trouvent dans la partie 5' conservée de l'intégron de classe 1 alors que les gènes de résistance aux ammonium quaternaires (*qacEΔ1*) et aux sulfonamides (*sul1*) se trouvent dans la partie 3' conservée. *IntI*: intégrase; *attC*: site de reconnaissance de l'intégrase; Pc: promoteur.

VI- Elements génétiques associés aux BLSE et carbapénémases, en particulier chez *K. pneumoniae*

- Les gènes *bla*_{-CTX-M}

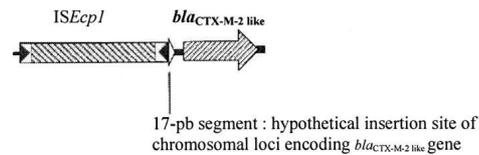
Différents éléments sont impliqués dans la mobilisation et l'expression des gènes *bla*_{-CTX-M}. Des séquences d'insertion comme *ISEcp1* sont retrouvées en amont de plusieurs gènes codant les CTX-M et en amont de certains gènes *ampC* en position plasmidique comme CMY-2 et ACC-1 (232, 92, 210). Cette IS code une transposase et joue en plus un rôle dans l'expression de ces enzymes par la présence d'une structure

promotrice située juste en amont du gène de résistance. D'autres séquences d'insertion, IS26 et IS903, flanquant le cadre de lecture des gènes bla_{CTX-M} ont également été décrites (37, 232). On a plus rarement retrouvé des CTX-M au sein d'intégrons comme CTX-M-9 et CTX-M-2 sur des intégrons de classe 1 (231, 86, 6, 220), (figure 24). On note une évolution des plasmides hébergeant les gènes bla_{CTX-M} . Les premières CTX-M ont été décrites sur des plasmides à large spectre d'hôte appartenant aux groupes d'incompatibilité A/C, L/M, N, I1, alors que les plus récentes, CTX-M-14 et CTX-M-15 sont hébergées sur des plasmides du groupe F, en particulier chez *E. coli* et *K. pneumoniae*.

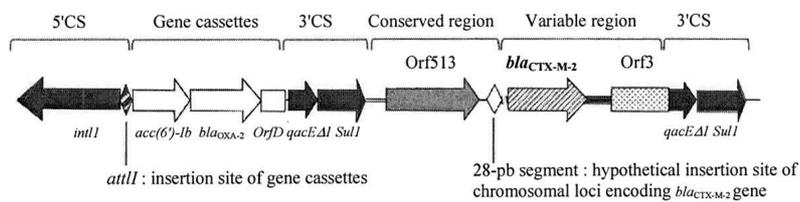
A : Chromosomal loci encoding bla_{KLUA} in *K. ascorbata*



B : plasmid-mediated $bla_{CTX-M-2}$ gene associated to *ISEcp1* and a 17-pb fragment of hypothetical insertion site associated to Orf513



C : plasmid-mediated $bla_{CTX-M-2}$ gene inserted in complex class I integrons *InS21* and *In35*



D : plasmid-mediated $bla_{CTX-M-9}$ gene inserted in complex class I integrons *In60*

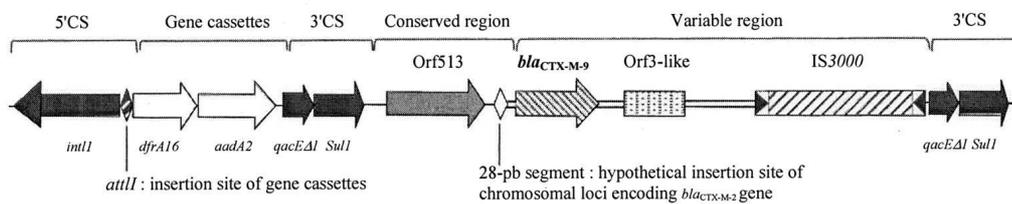


Figure 24: Comparaison de l'environnement génétique de bla_{CTX-M} dans le chromosome de *K. ascorbata* (A), associé à *ISEcp1* (B) ou inséré dans des intégrons de classe 1 *InS21* et *In35* (C) et *In60* (D). D'après Bonnet *et al.* (22).

- Les gènes bla_{TEM} sont véhiculés par des transposons unitaires de type Tn3, alors que les gènes SHV sont mobilisés et transférés par des transposons composites bordés par deux IS26 de même orientation.

- Les gènes correspondant aux BLSE comme VEB-1, IBC-1, GES-1 ou GES-3 sont le plus souvent retrouvés comme gènes cassettes dans des structures de type intégron (212).
- L'étude de l'environnement génétique des gènes de céphalosporinases acquises a démontré que la mobilisation de ces gènes faisait intervenir des transposons avec d'autres séquences d'insertion ou des structures d'intégrons complexes avec de nouvelles IS comme les ISCR1. (263)
- Les gènes *bla*_{KPC}

Ils ont largement été caractérisés (figure 25). La structure génétique encadrant *bla*_{KPC-2} a récemment été détaillée et a permis de caractériser un nouveau transposon de type Tn3, Tn4401 (10 kb) (13). Ce transposon possède également deux IS nommées ISKpn6 et ISKpn7, respectivement, situées immédiatement en aval et en amont de *bla*_{KPC-2}. Tn4401 a été décrit dans des souches d'origine géographiques diverses (95, 223, 258). Cependant, trois isoformes ont pu être caractérisées ; elles diffèrent par une délétion de 100 ou 200 pb en amont du gène *bla* (165, 13). Deux structures ont récemment été partiellement décrites et possèdent d'autres IS en amont du gène *bla*_{KPC-2}; cependant, dans les deux cas, la séquence en aval du gène *bla*_{KPC} correspond bien au transposon Tn4401, suggérant que ces nouvelles IS se sont insérées dans Tn4401. Une étude a identifié une région génétique complexe encadrant le gène *bla*_{KPC-3}. Le transposon Tn4401 s'est dans ce cas inséré dans un autre transposon, Tn1331, au niveau duquel un gène *qnrB19*, mobilisé par la séquence d'insertion *ISEcp1*, s'est également intégré, l'ensemble étant porté par le plasmide pLRM24. Tn1331 comporte également plusieurs gènes de résistance aux aminosides ainsi que d'autres gènes de β -lactamases (258).

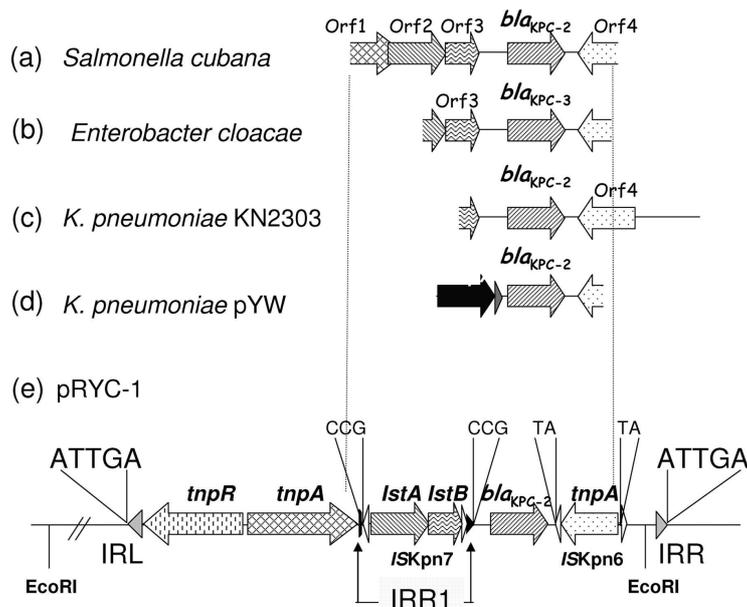


Figure 25 : Représentation schématique des structures portant les gènes *bla*_{kpc}. D'après Naas *et al* (177).

- gènes *bla*_{VIM}

Les β -lactamases de classe B contiennent des ions zinc dans leur site actif et constituent la famille des métallo- β -lactamases (MBL) avec les sous classes B1, B2, B3 (figure 26). L'acquisition de MBLs par des bactéries responsables d'infections représente une menace pour le traitement de ces infections. VIM représente une des principales MBL associées cliniquement à des pathogènes tels que *Pseudomonas* spp., les entérobactéries, et *Acinetobacter* spp. A ce jour, 27 variants ont été décrits dans 23 espèces de bactéries à Gram négatif dans 40 pays montrant le transfert horizontal et la distribution mondiale de ces enzymes.

Les enzymes VIMs sont formés généralement de 266 acides aminés (aa) à l'exception de VIM-7 (265 aa) (254) et VIM-18 (262 aa) (50). Les membres de la famille des VIMs partagent une identité allant de 72,9 à 99,6 % avec un écart de 1 à 72 acides aminés de différence. Les VIMs ont une distribution géographique : VIM-1 et VIM-4 se trouvent surtout en Europe, VIM-3 à Taiwan, VIM-6 en Asie, VIM-7 aux USA alors que VIM-1 a une distribution mondiale.

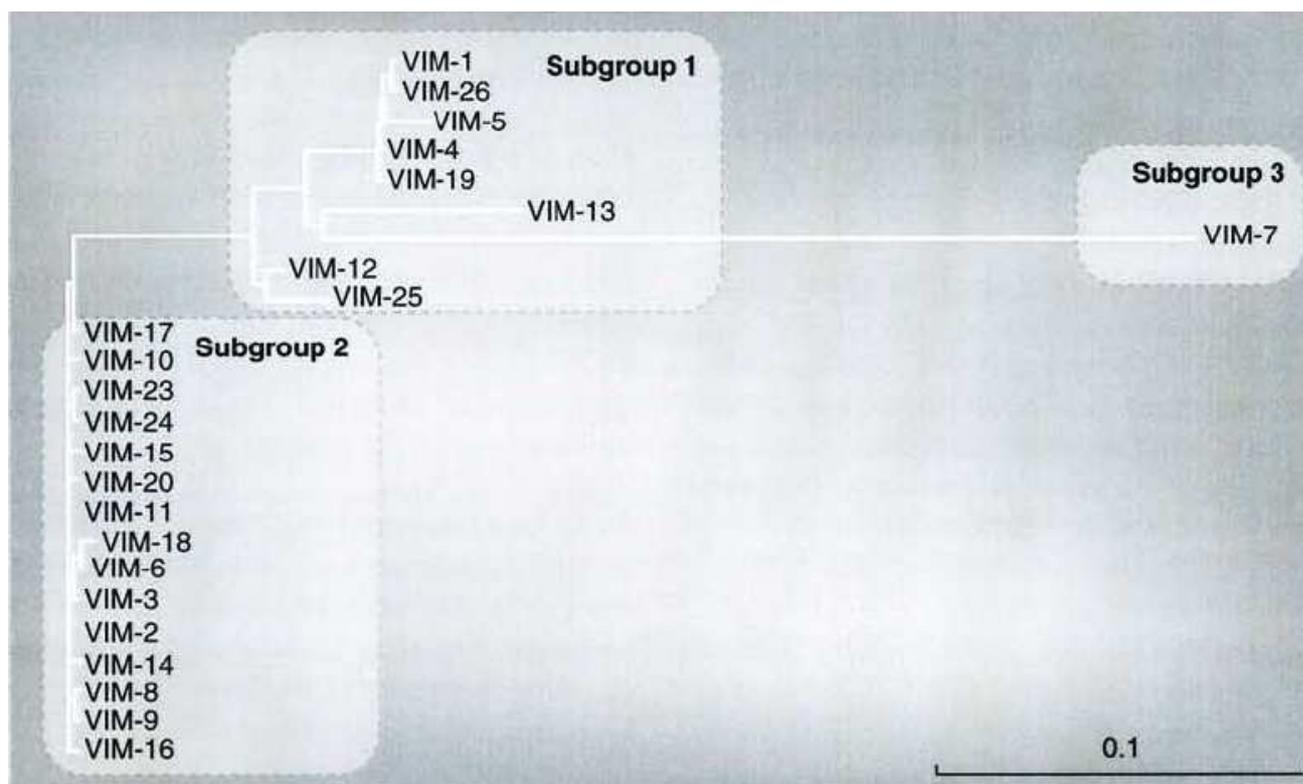


Figure 26 : Arbre phylogénétique de la famille des VIM. D'après Zhao *et al.* (291).

L'étude de l'environnement génétique de bla_{VIM} montre que dans la plupart des cas ces gènes sont portés par des intégrons de classe 1 (figure 27), qui sont généralement intégrés dans des transposons portés par des plasmides et sont alors très mobiles. Au moins 110 structures différentes portant bla_{VIM} et intégrons de classe 1 ont été décrites. Ces gènes co-existent avec d'autres gènes de résistance conférant une multirésistance aux souches bactériennes.

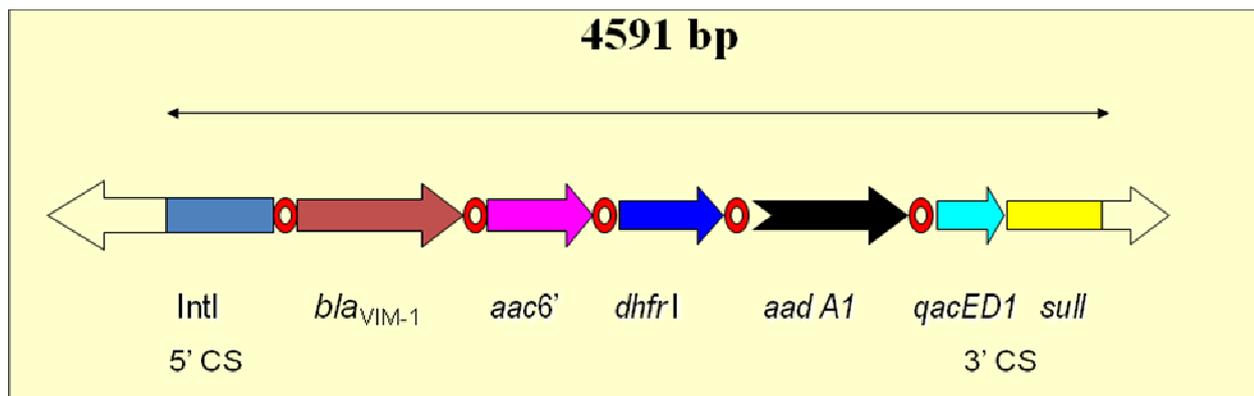


Figure 27 : Représentation d'un intégron de classe 1 portant le gène *bla*_{VIM-1}. Sont également présents les gènes cassettes de l'*aac(6')*-Ib (6'-N-aminoglycoside acetyl-transférase), *dhfrI* (dihydro-folate réductase) et *aadA1a* (adenyltransférase) : ces trois gènes impliqués dans la résistance aux aminosides. Dans la région 5' conservée se trouve l'intégrase et dans la région 3' conservée, le gène *qacD1* (conférant la résistance aux amoniums quaternaires), *sull* (conférant la résistance aux sulfamides).

- Les gènes *bla*_{NDM-1}

Il s'agit de la métallo-β-lactamase (Classe B de Ambler) de découverte la plus récente. Elle a été identifiée en Suède en 2008, dans une souche de *Klebsiella pneumoniae* et une souche d'*Escherichia coli* isolées chez un patient indien transféré d'un hôpital de New-Delhi (286). L'origine du gène *bla*_{NDM-1} est actuellement inconnue même si une source environnementale paraît probable.

Différentes études ont montré que la majorité des bactéries portaient le gène *bla*_{NDM-1} sur des plasmides conjugatifs de taille variable (50Kb > 500 kb) (147, 185, 186, 286). Ces plasmides appartiennent aux groupes d'incompatibilité IncA/C, IncF, IncL/M et certains sont non typables. Ces plasmides portaient généralement d'autres gènes de résistance aux β-lactamines mais également à d'autres familles d'antibiotiques (185, 186).

- Les gènes *bla*_{OXA-48}

Ce sont des β-lactamases de classe D qui ont essentiellement été décrites chez *Acinetobacter* spp. L'enzyme OXA-48 a été identifiée uniquement chez les entérobactéries (209, 213) et la première chez *K. pneumoniae* en Turquie (209).

Des études ont montré que les plasmides portant le gène *bla*_{OXA-48} provenant de différentes souches d'entérobactéries, de différents clones et de différents pays auraient des caractéristiques assez similaires (49, 73). Ce sont des plasmides conjugatifs ayant des tailles allant de 60 à 70 kb, sans marqueurs de résistance associés appartenant au groupe Inc L/M. Poirel *et al.* (215) ont séquencé un plasmide pOXA-48a et ont montré que le gène *bla*_{OXA-48} est localisé au sein d'un transposon (Tn1999) (Figure 28) comportant 2 séquences d'insertion identiques IS1999 assurant la mobilité et l'expression. Ce plasmide aurait une origine commune dans l'environnement avec les plasmides pCTX-M360 (127) et pHK-NDM (209), hypothèse renforcée par l'identification d'un gène *bla*_{OXA-48} dans *Shewanella xiamenensis* (216, 217). Cette analogie avec le plasmide Inc L/M pCTX-M-3 serait en faveur d'un pouvoir de dissémination important. L'analyse du contenu plasmidique de souches impliquées dans différentes épidémies en Europe et dans le pourtour méditerranéen, serait en faveur de la dissémination d'un clone (215).

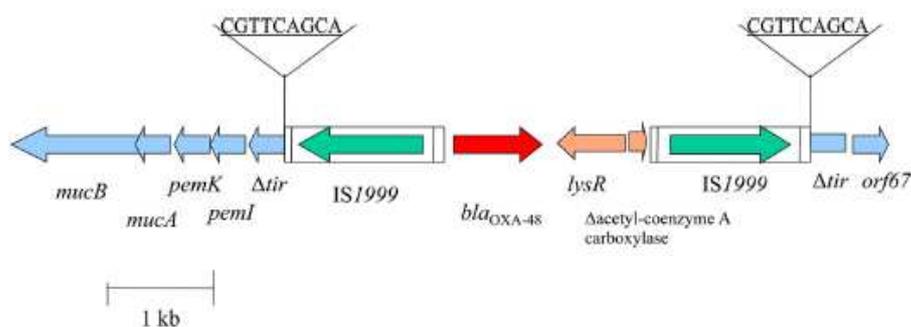


Figure 28: Environnement génétique de Tn1999. Le gène *bla*_{OXA48} est flanqué de 2 IS1999 et de 2 séquences répétées de 9 paires de bases, site de duplication. D'après Poirel *et al.* (215).

VII- Réplicons et plasmides séquencés de *K. pneumoniae*

La revue récente d'A. Carattoli montre la diversité des réplicons circulant chez *K. pneumoniae* (40, 41) (tableau 3). Ce sont des plasmides à large spectre d'hôte comme les groupes IncA/C, les IncL/M, et à un moindre degré IncHI2 ou à spectre plus étroit comme ceux du groupe IncF. De même, les différentes β -lactamases récentes sont retrouvées sur des

réplicons variés à l'exception peut-être de CTX-M-15 retrouvé préférentiellement sur des réplicons de type F aussi bien chez *K. pneumoniae* que *E. coli* et *S. enterica*.

Certains de ces plasmides de résistance ont été totalement séquencés ainsi que des plasmides de virulence comme pK2044 et pLVPK (tableau 4). Un total de 24 plasmides de plus de 20 kb est retrouvé dans la littérature. La grande majorité de ces plasmides appartient au groupe IncF (32) et IncN (18). On ne retrouve qu'un seul IncHI2, un seul IncL/M et un seul IncR. Pour quatre d'entre eux, l'origine de répllication est inconnue. Le système d'addiction le plus répandu est *vagCD* et en particulier au sein du groupe IncF. Une observation intéressante concerne la fréquence de la résistance aux métaux lourds associée à la multirésistance aux antibiotiques : β -lactamases, enzymes d'inactivation des aminosides, résistance aux sulfamides et au triméthoprime. On peut également noter la très grande fréquence des séquences d'insertion avec la prépondérance de IS1, et surtout de IS26 qui est retrouvée jusqu'à 10 copies sur un seul et même plasmide. Seuls les deux plasmides retrouvés chez les souches virulentes portent les gènes de virulence *rmpA* et *iroN*.

Les plasmides décrits varient dans leur nature, leur taille et sont le plus souvent transférables chez *E. coli* (223). Ils portent fréquemment d'autres gènes de résistance notamment aux aminosides et/ou aux fluoroquinolones, parfois même d'autres β -lactamases comme CTX-M-15 (65).

Tableau 3 : plasmides porteurs des nouvelles beta-lactamases retrouvés chez *K. pneumoniae*.

Beta-lactamase	Inc	Autres espèces concernées
CTX-M-1	N FII	<i>E. coli</i> ,
CTX-M-3 (ArmA)	L/M	<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. marcescens</i>
CTX-M-9	HI2 P I1 FII, FIB	<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>S. enterica</i> <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> ,
CTX-M-15, TEM-1, AAC(6)-IB-cr	FII, FIA, FIB NT	<i>E. coli</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. enterica</i> [Enteritidis] <i>E. coli</i>
CTX-M-17	ColE	
CTX-M-62	NT	
SHV-5	L/M FII, FIB	<i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> <i>E. coli</i> ,
SHV-12	I1 K FII, FIB FIKd	<i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. marcescens</i>
CMY-8 (CTX-M-3)	ColE HI2 ColE	<i>S. enterica</i> [Typhimurium]
KPC-2	N ColE	
IMP-4 QnrB2, QnrB-4, ArmA	L/M A/C NT	<i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. amalonaticus</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>M. morgani</i> <i>E. coli</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i>
VIM-1	N I1 NT	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>
VIM-4 (CMY-4)	A/C	<i>E. cloacae</i>

Tableau 4 nom	N° accession	Taille (pb)	Groupe d'incompatibilité	Systèmes d'addiction	Systèmes de partition	Résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds	Séquences d'insertion (n)	gènes de virulence		
pKP187	CP000965	187922	IncFIB	VagCD	sopAB	arsenical resistance, tellurite resistance	IS3 (4), IS110, IS91, IS903, IS30 (2)		Fouts,D.E., et al.	PLoS Genet. 4 (7), E1000141 (2008)
pK2044	AP006726	224152	IncFIB, IncRepLVPK	VagCD	parAB, sopABC	Silver resistance, tellurite resistance, copper resistance	IS102 (3), IS1 (3), ISEc27 (2), IS100, IS903	rmpA, Iron	Wu,K.M., et al.	J. Bacteriol. 2009 191 (14), 4492-501 (2009)
pLVPK	AY378100	219385	IncFIB, IncRepLVPK	VagCD	parAB, sopAB	tellurite resistance	IS903, IS1,(2) IS2	rmpA, rmpA2, IutC, Iron	Chen,Y.T., et al.	Gene. 2004 Aug 4;337:189-98.
pKPN3	CP000648	175879	IncFIB, IncFII like, incFIA		sopAB	arsenical resistance	IS903 (2), IS5 (2)		McClelland,M., et al.	Direct Submission
pKF3-70	FJ494913	70057	IncFII		stbAB	CTX-M-14	ISEcp1		Yi,H., et al.	PLoS ONE 2010; 5 (1), E8601
p1658/97	AF550679	125491	IncFII like	pemIK, Hok-Sok, vagCD	sopABC	SHV-5, aac, aad, int, sul1	IS26 (4), IS1 (5), IS21	HlyC, HlyF	Zienkiewicz M, et al.	AAC 2007; 51:1 164-71.
pKP048	FJ628167	151188	IncFII like	vagCD	parAB, stbAB	KPC-2, mph2, armA, sul1, DHA-1, qnrB4, mercury resistance	IS26 (3), ISEc29, ISEc28, ISCR1, IS4321, IS1 (3), IS66		Jiang,Y., et al.	AAC 2010; 54: 3967-9
pKPN4	CP000649	107576	IncFII like	vagCD	parAB, stbAB	SHV-12, aac(6'), aadA, TEM-1, mercury resistance	IS26 (3)		McClelland,M., et al.	Direct Submission
pKpQIL	GU595196	113637	IncFII like	vagCD	parAB, StbAB	KPC-3, OXA-9, TEM-1			Leavitt,A., et al.	AAC 2010; 54: 4493-6
pKF3-140	FJ876827	147416	incFII like, IncFIB,	pemKI, ccdAB, phd/doc,		dfr, aadA, MphR, aph3', tetA, aac	IS10, IS1, InsBcp5, IS5, IS1		Zhao,F., et al.	PLoS ONE 2010; 5 (4), E10141
pK29	EF382672	269674	IncHI2	hipBA, relEB	parAB mucAB	CTX-M-3, CMY-8, aph3, aadA2, aac3, CatB2, Tet, Sul1,tellurite resistance, arsenical resistance	IS26 (4), IS30, IS903 (2), IS5, ISCP5, IS150, IS1, ISEcp1 (2), IS630		Chen,Y.-T., Wu,K.-M., Liao,T.-L., Shiao,Y.-R., Yan,J.-J., Su,I.-J., Lauderdale,T.-L. and Tsai,S.-F.	AAC 2007; 51: 3004-7
pCTXM360	EU938349	68018	IncL/M	pemKI	parAB	CTX-M-3, TEM-1			Zhu WH, et al.	AAC 2009; 53: 5291-3
pKlebpneu12	FJ223605	75617	IncN		stbAB,	int, dfrA14, Sul2, aph3', TEM-1 OXA-9, aadA3, aac6', KPC-3,arsenical resistance	IS26, IS4		Gootz,T.D., et al	AAC 2009;53, 1998-2004
pKlebpneu15	FJ223607	23753	IncN	relE/stbE					Gootz,T.D., et al.	AAC 2009; 53: 1998-2004
pKlebpneu9	FJ223607	70655	IncN		stbAB,	2 KPC-2, aac6'	IS4 (4), ISEc8 (2)		Gootz,T.D., et al.	AAC 2009; 53: 1998-2004
pKOX105	HM126016	54641	IncN		stbAB	aacA4, VIM-1, QnrS1, SHV-12 dfrA14	IS26 (3), IS6100		Carattoli A, et al.	JAC 2010;65: 2070-5.
pKP96	EU195449	67850	IncN		stbAB	aac(6')-lb-cr, 2 sul1, qnrA1, fosA, CTX-M-24, tetA	ISCR1, IS6100, IS1, 2 IS10, ISEcp1, IS903		Shen,P., et al.	JAC 2008; 62: 1252-6
pNL194	GU585907	79307	IncN		stbAB	dfrA12, aadA2, 2 sul1, AphA1, 2 aadA1, 2 dfrA1, strA, aacA7,VIM-1, mercury resistance	IS6100 (2), IS26 (4), IS1, IS1333, IS903, IS1222		Miriagou,V., et al.	AAC 2010; 54: 4497-502
pKPN5	CP000650	88582	IncR		parAB, stbAB	Aph(3''), 2 sul, Aph(3'), dfr, cmlA1, ant, cmlA2, tetD, TEM-1			McClelland,M., et al.	Direct Submission
pK245	DQ449578	98264	ND		parAB mucAB,	SHV-2, qnr-S aac-2, sul2, TetD, catA2, dfrA14, int, TEM	IS26 (10), IS1222, IS6100, IS15		Chen,Y.T., et al.	AAC 2006; 50 (11), 3861-6
pKF3-94	FJ876826	94219	ND	ccdAB,		TEM-1, CTX-M-15			Zhao,F., et al.	PLoS ONE 2010; 5 (4), E10141 (2010)
pKP91	CP000966	91096	ND	ccdAB	parAB		IS110 (4), IS903, IS6, IS3		Fouts,D.E., et al.	PLoS Genet. 4 (7), E1000141 (2008)
pMET-1	EU383016	41723	ND		ParAB	TEM-1, 2 OXA-9, 2 AadA, 2 aac(6')-Ib			Soler Bistue,A.J., et al.	PLoS ONE 3 (3), E1800 (2008)
pOXA48	JN626286	61881	IncL/M		ParAB	OXA-48	IS1999		Poirel et al.	AAC 2012 56(1)

TRAVAIL PERSONNEL

Objectifs du travail

K. pneumoniae, depuis toujours joue un rôle important dans l'apparition et/ou la dissémination des résistances en particulier vis-à-vis des β -lactamines. Dans les années 80, suite à l'introduction en thérapeutiques anti-infectieuse des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), les premières BLSE ont été décrites chez *K. pneumoniae* (143, 244). Ces premières BLSE, de type TEM ou SHV, ont très rapidement diffusé dans le monde et ont été responsables d'épidémies dans les hôpitaux. Suite à la mise en place au niveau national d'un plan de maîtrise des bactéries multi-résistantes en 1991, on a assisté en France, à une diminution des épidémies dues à *K. pneumoniae* jusqu'en 2000 où on observe deux phénomènes : (i) on assiste à une ré- augmentation des souches d'entérobactéries productrices de BLSE (ESBL) dans les hôpitaux mais cette fois, ce sont essentiellement des *E. coli* (ii) de nouvelles épidémies à *K. pneumoniae* BLSE et dans les deux cas, une nouvelle série d'enzymes, les CTX-M, en est responsable. En 2003, dans le service de chirurgie digestive de l'hôpital Paul Brousse est isolée une souche de *K. pneumoniae*, issue d'un écouvillonnage rectal de dépistage, résistante à tous les antibiotiques y compris aux carbapénèmes. Il s'agissait de la première souche d'entérobactérie productrice de carbapénémase rapportée en France. Cette souche productrice d'une carbapénémase de type VIM-1, associée à une BLSE de type SHV-5, a été responsable d'une épidémie avec 7 cas secondaires (annexe 1). Depuis 2003, de nombreux hôpitaux ont été confrontés à des épidémies de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases, essentiellement dues à *K. pneumoniae* (261, www.invs.sante.fr).

En septembre 2009, l'hôpital Paul Brousse est une fois de plus confronté à une épidémie en rapport avec une *K. pneumoniae*, productrice cette fois, d'une carbapénémase de type KPC. Le cas index était un patient grec ayant des antécédents d'hospitalisation en Crête.

Dans les deux cas, grâce à la mise en place de mesures d'hygiène drastiques, ces épidémies ont pu être contrôlées et stoppées.

Objectifs du travail de thèse

Dans un premier temps, nous nous proposons (i) de décrire les mesures qui nous ont permis de maîtriser notre première épidémie à *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase de type VIM puis notre seconde épidémie à liée à des souches productrices de KPC et les mesures préventives que nous avons mis en place depuis 2004 et, (ii) de décrire l'épidémie due à la souche de *K. pneumoniae* productrice d'une carbapénémase de type KPC en comparaison à l'épidémie due à la *K. pneumoniae* productrice de VIM.

Dans un deuxième temps, nous avons approfondi cette étude par:

- 1- L'analyse des facteurs de virulence d'une collection de souches multirésistante de *K. pneumoniae* ;
- 2- L'analyse des plasmides porteurs de cette multirésistance par *PCR replicon typing method* (PRTM) ainsi que la recherche de systèmes d'addiction sur ces plasmides ;
- 3- Le séquençage et l'analyse du plasmide porteur du gène *bla_{KPC}* responsable de l'épidémie dans notre hôpital.

Par ce travail, nous désirions répondre à plusieurs questions :

- Existe t-il des plasmides particuliers impliqués dans l'émergence et la dissémination de la résistance chez *K. pneumoniae* ?
- Existe -t-il un lien entre la virulence et la résistance ?

Publication N° 1

Extended measures for controlling an outbreak of VIM-1 producing imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a liver transplant centre in France, 2003-2004.

N Kassis-Chikhani, F Saliba, A Carbonne, S Neuville, D Decre, C Sengelin, C Guerin, N Gastiburu, A Lavigne-Kriaa, C Boutelier, G Arlet, D Samuel, D Castaing, E Dussaix, V Jarlier.

Euro Surveill. 2010 Nov 18;15(46).

Afin de lutter contre la dissémination de bactéries hautement résistantes, il est essentiel de comprendre les mécanismes génétiques impliqués, mais également de mettre en place des mesures d'hygiène adaptées à ces situations afin de prévenir, et le cas échéant, de stopper les transmissions de ces bactéries dans nos hôpitaux.

Depuis plusieurs années, les bactéries « hautement résistantes », notamment celles productrices de carbapénémases, font l'objet d'une surveillance toute particulière par les autorités sanitaires Françaises dont l'objectif est d'éviter leur dissémination.

En 2003, le service de chirurgie digestive de l'hôpital Paul Brousse a été confronté à une épidémie impliquant une souche de *K. pneumoniae* produisant une carbapénémase de type VIM-1 associée à une β -lactamase à spectre étendu de type SHV-5. Ce service comporte 81 lits dont 15 de réanimation. Le service s'étend sur 3 étages, le 1^{er} héberge la réanimation tandis qu'aux 3^{ème} et 4^{ème} étages se répartissent respectivement 30 et 36 lits, uniquement des chambres seules.

I- Description de l'épidémie

Le cas index était un patient grec transféré d'un hôpital grec en réanimation pour une transplantation hépatique en urgence suite à une hépatite fulminante le 2 décembre 2003. Dans un dépistage par écouvillonnage rectal à l'admission, une souche de *K. pneumoniae* productrice d'une carbapénémase de type VIM (**KpVIM**) a été mise en évidence. Depuis la mise en place en 2002 d'un dépistage systématique à l'admission des patients en réanimation à la recherche d'entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE), aucune souche ayant ce phénotype n'avait été isolée. Nous avons appris plus tard que l'hôpital d'où venait le patient faisait face à une épidémie à KpVIM. Au total, 7 cas secondaires ont été retrouvés (figure 1). Tout

patient colonisé ou infecté par cette souche a été défini comme étant un cas secondaire. Parmi ces patients, 2 avaient une colonisation digestive et 5 une infection. Les caractéristiques des patients sont détaillées dans le tableau 1. Six des sept cas secondaires étaient des patients ayant eu une transplantation hépatique. Ces patients avaient entre 46 à 69 ans (moyenne à 62 ans). Le délai d'acquisition entre l'admission et le premier prélèvement positif était entre 13 et 206 jours (moyenne 101 jours).

Figure 1 : Courbe synoptique des cas.

Synoptic curve of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* cases (infection and colonisation) in an abdominal surgery care centre, France, December 2003 to October 2004 (n=8)

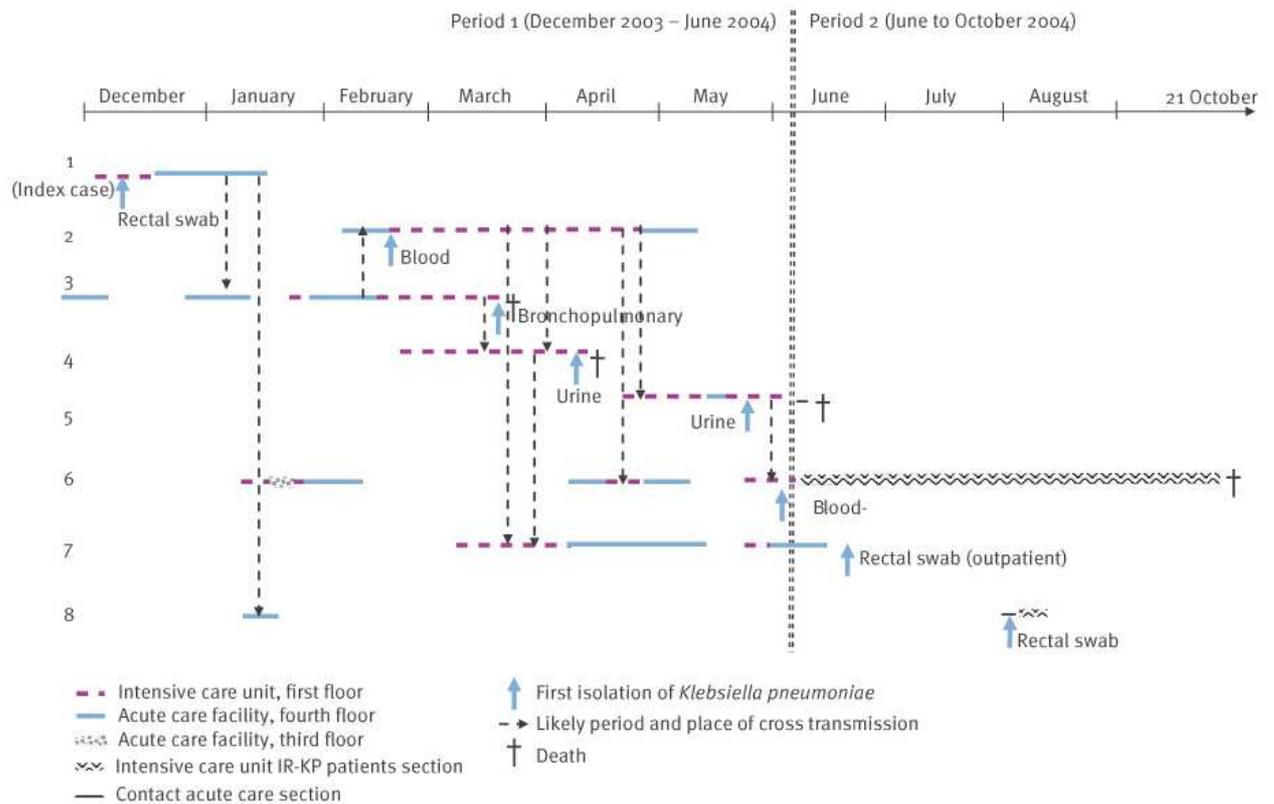


Tableau 1 : Caractéristiques des patients colonisés ou infectés par la souche de KpVIM (IR-Kp) (n=8).

Case	Age (years)	Date of admission	Clinical events	First isolate: site	Interval between admission and IR-Kp isolation (days)	Antibiotic treatment	Outcome	Suspected place of acquisition
1	in their 20s	December 2003	Liver transplantation	rectal swab	0	No treatment	Discharged	Index case transferred from Greece
2	in their 50s	December 2004	Liver transplantation	blood culture	13	No treatment	Discharged	Acute care facility
3	in their 60s	September 2003	Liver transplantation	tracheal fluid	175	Piperacillin/tazobactam Ciprofloxacin ^a	Deceased (due to IR-Kp infection)	Acute care facility
4	in their 60s	February 2004	Liver transplantation	urine culture	48	No treatment (asymptomatic)	Deceased	Intensive care unit
5	in their 70s	April 2004	Liver cirrhosis	urine culture	31	No treatment (asymptomatic)	Deceased	Intensive care unit
6	in their 50s	January 2004	Liver transplantation	blood culture	173	Colistin	Deceased (due to IR-Kp infection)	Intensive care unit
7	in their 50s	March 2004	Liver transplantation	rectal swab	101	No treatment	Discharged	Intensive care unit
8	in their 40s	January 2004	Liver transplantation	rectal swab	206	No treatment	Discharged	Acute care facility

^a Two antibiotics to which the strain was resistant. IR-Kp was identified post mortem.

II- Traitement et devenir des patients

Le cas index, colonisé pendant toute la durée de son hospitalisation, n'a pas reçu d'antibiotiques pendant son séjour, et est reparti en Grèce en janvier 2004.

Concernant les cas 2 à 6 : le cas 2 a eu une infection sur cathéter central résolutive après ablation et n'a pas reçu d'antibiotiques; le cas 3 est décédé d'un choc septique, pour lequel il avait reçu l'association pipéracilline-tazobactam et de la ciprofloxacine, avant que la souche de KpVIM, résistante aux 2 antibiotiques utilisés, ne soit isolée des hémocultures. Les cas 4 et 5 ont eu une infection urinaire asymptomatique n'ayant pas nécessité d'antibiotiques. Le cas 6 a eu des abcès hépatiques traités par colistine et ayant récidivé 4 mois après. Le patient est décédé d'un tableau clinique associant une bactériémie et une défaillance du greffon hépatique. Les cas 7 et 8, colonisés n'ont pas été traités.

Les cas 1, 2, 7, et 8 sont repartis à domicile, les cas 3, 4, 5, 6 sont décédés ; pour deux d'entre eux le décès est en lien avec l'infection à KpVIM.

La négativité des dépistages des cas 2 et 7 a été obtenue en 15 mois alors que le cas 8 était toujours colonisé en juillet 2008 (4 ans après).

III- Mesures de contrôle

1) Pendant la première période (2 décembre 2003 au 2 juin 2004)

Immédiatement après l'identification du cas index, les mesures « classiques », habituellement préconisées, pour la prise en charge des patients porteurs de bactéries multirésistantes (74). Ont été mis en oeuvre: isolement géographique en chambre seule, précautions de type « contact » avec surblouse avant d'entrer dans la chambre, désinfection des mains par des solutions hydroalcooliques avant d'entrer et en sortant de la chambre, bionettoyage de la chambre. Le personnel a été informé et formé afin que les mesures soient strictement appliquées. Tous les patients hospitalisés en réanimation ont été dépistés une fois par semaine et ce dépistage a été maintenu lorsque les patients ont été transférés dans les unités d'hospitalisation.

Malgré ces mesures, 5 nouveaux cas ont été identifiés, ce qui nous a amené à mettre en place des mesures plus drastiques afin de stopper les transmissions croisées.

2) Seconde période (2 juin au 21 octobre 2004)

Des mesures complémentaires ont été mises en place en collaboration avec l'équipe opérationnelle (EOH) du siège de l'AP-HP :

- A) Le service a été divisé en 5 secteurs (Tableau 2) afin de séparer les cas, les patients « contacts », et les patients n'étant ni des cas ni des contacts. Les patients contacts ont été définis comme des

patients ayant été hospitalisés pendant la même période et au même étage qu'un cas avant le 2 juin.

Tableau 2 : Organisation des différents secteurs en réanimation et en hospitalisation pendant la deuxième période du 2 juin au 21 octobre 2004.

	Separation with plastic wall ↓	
First floor intensive care unit	IR-Kp patients section IR-Kp patients who stayed in intensive care until discharge Number of beds ^a : 3	IR-Kp-free – long stay intensive care unit section Patients requiring intensive care for an expected duration of more than 48 hours Number of beds ^a : 12
Third floor acute care facility	IR-Kp free patients non-intensive care unit section Patients directly admitted to the acute care facility Number of beds ^a : 25	IR-Kp-free – short stay intensive care unit section Patients having major surgery but requiring monitoring for less than 48 hours Number of beds ^a : 5
Fourth floor acute care facility	Contact acute care section Patients hospitalised on the same floor and at the same time as an IR-Kp patient Number of beds ^a : 36	

IR-Kp: imipenem-resistant VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*.

^a Only single bedrooms.

B) L'organisation des soins a totalement été modifiée :

- a. Du personnel paramédical a été exclusivement affecté à chaque secteur ;
- b. Les admissions ont été limitées aux urgences et aux transplantations hépatiques ;
- c. Le transfert vers d'autres unités de soins a été autorisé uniquement pour les patients non porteurs de la KpVIM ;
- d. Aucun transfert des cas na été effectué en dehors d'urgence vitale ou de la réalisation d'examens complémentaire et ce, sous contrôle de l'EOH locale ;
- e. En cas de réadmission d'un cas, il était directement admis dans le secteur réservé aux cas et, s'il venait en consultation, l'EOH était informée et des mesures d'hygiène à type de précautions contact étaient prises et le patient était systématiquement dépisté.
- f. Des réunions quotidiennes ont été organisées avec les équipes soignantes par l'EOH locale afin de s'assurer de l'application des mesures.

C) Les mesures suivantes ont également été mises en place :

- a. Un contrôle de la prescription des antibiotiques en particulier des carbapénèmes ;
- b. Une lettre d'information a été affichée au bureau d'accueil des patients à chaque étage ;
- c. Une lettre d'information a été régulièrement envoyée aux autres services ;
- d. Les cas ont été informés de leur statut et invités à revenir préférentiellement dans le service en cas de problème médical ou à en informer le service receveur afin qu'il prenne contact avec nous.

D) Les autorités sanitaires françaises ont demandé que soit organisée une campagne de dépistages des patients contacts ayant été hospitalisés pendant la première période et qui n'avaient pas été dépistés. Un courrier leur a été envoyé les invitant à téléphoner à la cellule d'appels mise en place entre le 26 juillet et le 6 août. Deux médecins seniors et un interne répondaient aux appels. Ils proposaient aux patients de faire un dépistage (i) soit dans notre hôpital, (ii) soit dans un laboratoire proche de chez eux, et les instructions étant alors envoyées par fax au laboratoire, (iii) soit l'envoi d'écouvillons à nous renvoyer dans des enveloppes prépayées dans un emballage approprié leur était aussi proposé.

En juin 2004, une alerte nationale et européenne, décrivant cette souche, a été mise en ligne respectivement sur le site de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et la « Early Warning Response System of the European health authorities ».

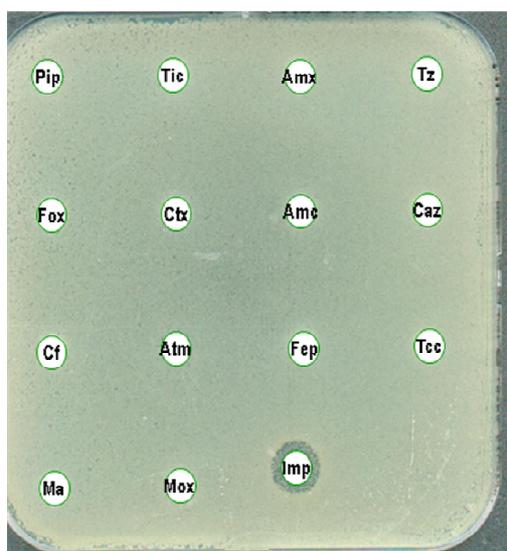
Ces mesures ont été maintenues jusqu'en octobre 2004 quand le dernier cas a été transféré dans le service des Maladies Infectieuses

dans un secteur dédié avec du personnel dédié. Le patient est décédé le 15 décembre 2004.

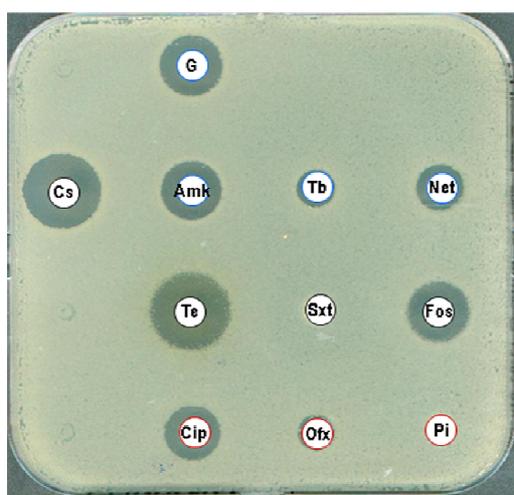
Les dépistages des patients contacts ont été maintenus jusqu'à la fin de l'année 2005 en raison d'une diminution du nombre de contacts revenant dans le service et les patients revenant avaient au moins trois dépistages négatifs (en moyenne 10 dépistages).

IV- Diagnostic bactériologique

L'antibiogramme était le suivant :



PIP : pipéracilline
TIC : ticarcilline
AMX : amoxicilline
TZP : pipéracilline+tazobactam
FOX : céfoxitine
CTX : céfotaxime
AMC : amoxicilline + acide clavulanique
CAZ : ceftazidime
CF : céfalotine
ATM : aztréonam
FEP : céfépime
TCC : ticarcilline + acide clavulanique
MA : céfamandole
MOX : moxalactam
IPM : imipénème



G : gentamicine
CS : colistine
AMK : amikacine
TB : tobramycine
NET : nétilmicine
TE : tétracycline
SXT : cotrimoxazole
FOS : fosfomycine
CIP : ciprofloxacine
OFX : ofloxacine
PI : acide pipémidique

Les tests phénotypiques qui ont été réalisés sont les suivants :

Pour rechercher la métallo- β -lactamase (MBL), (i) un test à l'EDTA : deux disques d'imipénème, dont un est imprégné de 4 μ l d'EDTA 0.5M pH8 sont disposés sur une gélose ensemencée avec la souche de *K. pneumoniae* à tester; le test est considéré comme positif si on observe une différence de 5 mm entre les disques avec ou sans EDTA (Figure 1) (155). Ce test était positif pour cette souche (ii) une bandelette Etest imprégnée sur une moitié par de l'EDTA qui montre un rétablissement de la sensibilité de la souche à l'imipénème après inhibition de la MBL par l'EDTA (Figure 2).

Cette MBL n'expliquant pas la résistance à l'aztréonam (probablement due à la présence d'une BLSE), le test suivant a été réalisé : sur une boîte de Muller Hinton (MH) préalablement ensemencée avec la souche de *K. pneumoniae* à tester, un disque de l'association amoxicilline et acide clavulanique (AMC) imprégné de 4 μ l d'EDTA 0.5M pH8 (inhibition de la MBL) a été posé au centre de la boîte et de part et d'autre un disque de ceftazidime et de céfépime : on constate la présence d'une synergie signant la présence d'une BLSE (Figure 3).

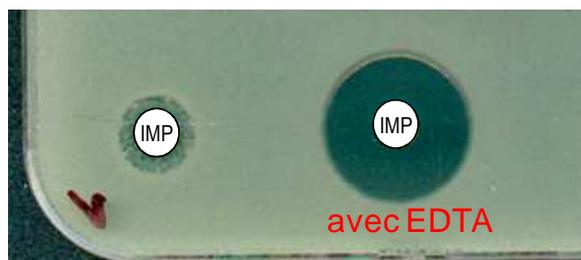


Figure 1: test à l'EDTA positif: 2 disques d'imipénème, dont 1 imprégné d'EDTA, sont disposés sur une gélose ensemencée avec la souche de *K. pneumoniae* à tester ; la différence entre les 2 disques est supérieure à 5mm.

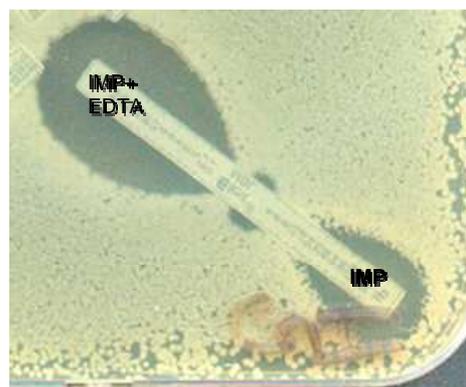


Figure 2 : une bandelette Etest imprégnée sur une moitié par de l'EDTA qui montre un rétablissement de la sensibilité de la souche à l'imipénème après inhibition de la MBL par l'EDTA.

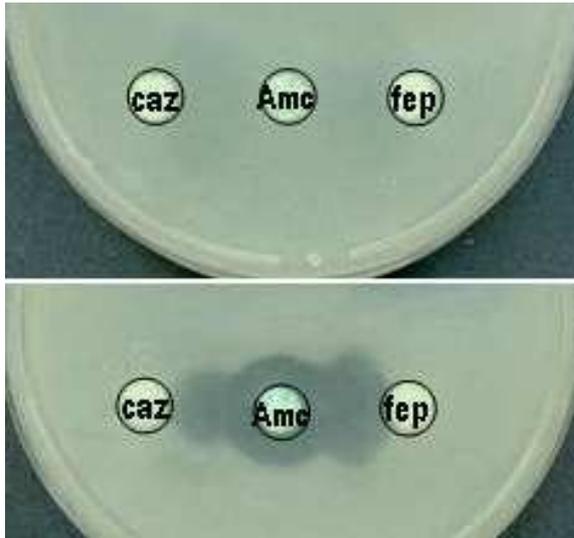


Figure 3 : en haut : disque d'AMC sans EDTA : pas de synergie ; en bas disque d'AMC avec EDTA: présence d'une synergie en rapport avec la production d'une BLSE.

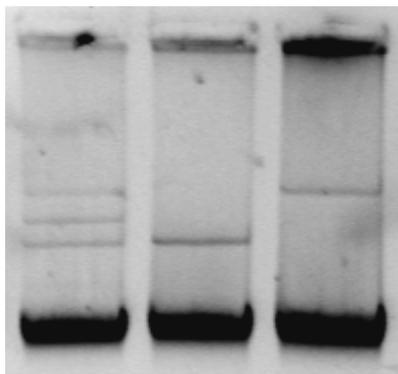
L'analyse par PCR, au moyen d'amorces spécifiques des carbapénémases et BLSE, suivi du séquençage des produits de PCR ont confirmé la présence d'une BLSE de type SHV-5 et d'une MBL de type VIM-1.

Le transfert par conjugaison du gène codant la BLSE n'a pu être obtenu que pour une souche. Le transfert du gène *bla*_{VIM} a été obtenu pour toutes les souches mais uniquement par électroporation. Ces observations suggèrent que le plasmide codant pour la carbapénémase VIM n'est pas conjugatif.

L'analyse du contenu plasmidique des souches par lyse alcaline (137) a mis en évidence la présence de 3 plasmides, une d'environ 100 kb, un de 130 kb et un de plus de 150 kb.

L'analyse par PCR des électroporants a montré que les gènes codant les enzymes de type VIM et SHV étaient portés par deux plasmides différents et que le gène *bla*_{VIM} était porté par le plasmide de plus de 150kb.

Kp S V

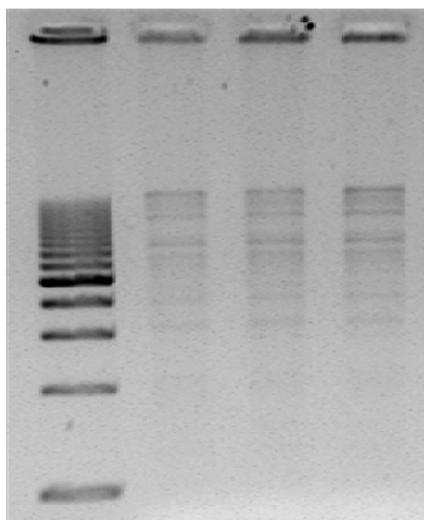


Extraction plasmidique par la méthode de lyse alcaline.

Kp : souche parentale portant 3 plasmides ; S : plasmide portant le gène *bla_{SHV-5}* (~ 100 kb) ; V : plasmide portant le gène *bla_{VIM-1}* (> 150 kb)

La digestion par l'enzyme de restriction EcoR1 des plasmides portant le gène *bla_{VIM}* a montré que toutes les souches portaient le même plasmide.

MT V1 V2 V3



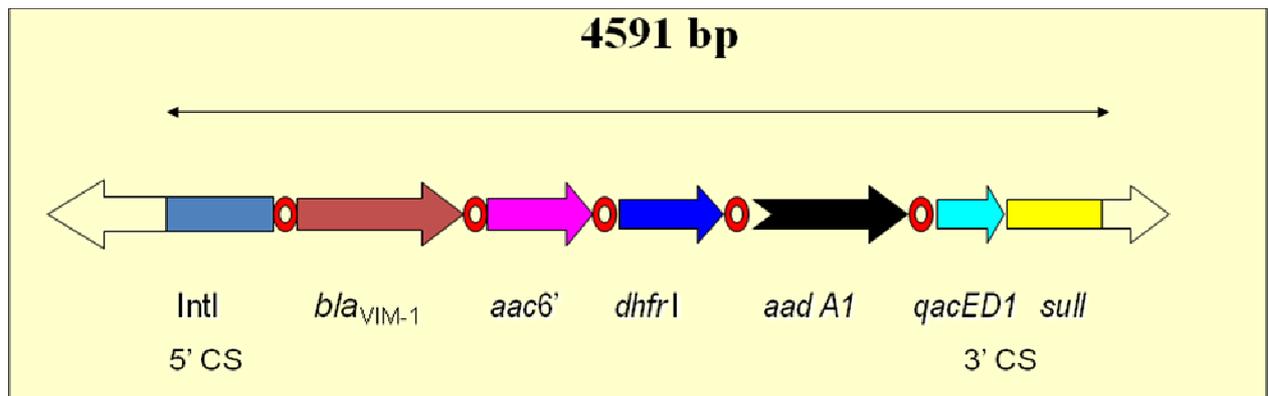
Profils de restriction des plasmides portant le gène *bla_{VIM-1}* de 3 souches par EcoR1.

La méthode de typage des plasmides par PRTM selon la méthode de Carattoli *et al.* (38) n'a pas permis de déterminer le groupe d'incompatibilité du plasmide portant le gène *bla_{VIM}*.

Après clonage et séquençage des fragments d'ADN, 2 types de clones ont été obtenus, l'un portant le gène *bla_{VIM-1}* et l'autre *bla_{SHV-5}*. L'analyse des séquences nucléotidiques du clone portant *bla_{VIM-1}*, a montré que celui-ci était porté par un intégron de classe 1. De plus, étaient présents les gènes

cassettes de l'*aac(6')*-Ib (6'N-aminoglycoside acetyl-transférase), *dhfrI* (dihydrofolate réductase) et *aadA1a* (adenyltransférase), ces trois gènes étant impliqués dans la résistance aux aminosides.

Dans la région 5' conservée se trouve l'intégrase et dans la région 3' conservée, le gène *qacD1* (conférant la résistance aux ammoniums quaternaires) et le gène *sulI* (conférant la résistance aux sulfamides).



Représentation de l'intégron de classe 1 portant le gène *bla_{VIM-1}*.

V- Analyse épidémiologique

Le taux d'infection ou de colonisation a été calculé pour les patients admis dans le service entre décembre 2003 (mois d'admission du cas index) et juin 2004 (mois du dernier cas). Nous avons calculé des taux chez les patients transplantés et non transplantés d'une part et en fonction de l'unité d'hospitalisation (réanimation ou secteur de soins aigus) d'autre part. Nous avons utilisé le test exact de Fischer pour comparer les variables et $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

1) Première période :

Pendant la première période 325 patients ont été hospitalisés en réanimation (dont 237 également hospitalisés dans le secteur de soins aigus), et, 375 autres patients ont été hospitalisés uniquement dans le

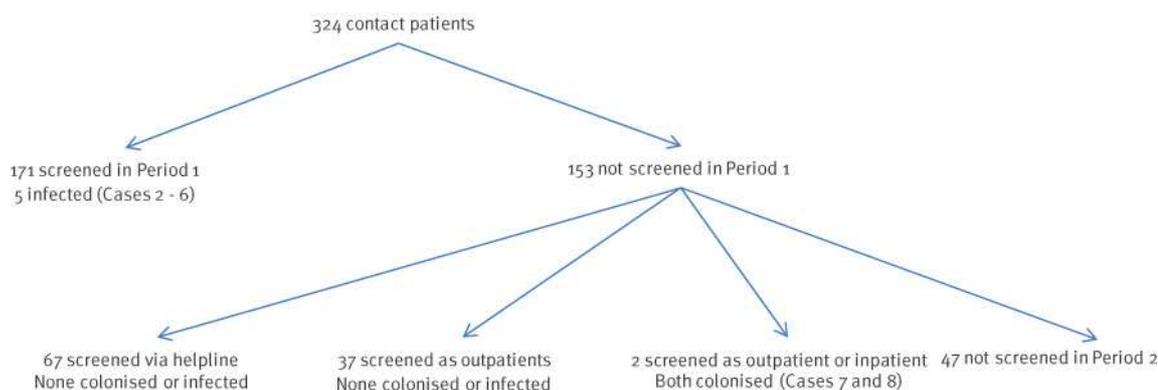
secteur de soins aigus, soit au total 700 patients. Cinq cas secondaires ont été détectés (cas 2 à 6) et tous avaient une infection à KpVIM (deux bactériémies, une infection pulmonaire, deux infections urinaires) (Tableau 1). L'analyse du tableau synoptique suggère que 3 patients (cas 4, 5, et 6) avaient acquis l'infection en réanimation et le 2 autres cas (cas 2 et 3) dans le secteur d'hospitalisation aigu au 4^{ème} étage (figure 1).

Pendant cette période, 324 des 700 patients hospitalisés ont été exposés (contacts). Cent soixante et onze d'entre eux avaient été dépistés pendant leur séjour. Les 153 autres patients non dépistés, essentiellement en raison d'une durée courte d'hospitalisation ont été la cible de la campagne de dépistage.

2) Deuxième période :

Pendant la campagne de dépistage, 75 des 153 patients contacts non dépistés pendant la première période ont contacté la cellule téléphonique, 67 ont accepté d'être dépistés (54 dans notre hôpital, 13 dans un autre laboratoire). Trente-sept autres patients n'ont pas téléphoné mais ont été dépistés à l'occasion d'une consultation. Au total, 104 des 153 contacts non dépistés pendant la première période ont pu l'être pendant la seconde (figure 2).

Figure 2 : Patients dépistés pendant l'épidémie à *K. pneumoniae* productrice d'une carbapénémase de type VIM dans un centre de chirurgie entre le 2 décembre 2003 et le 21 octobre 2004.



De plus, 2 nouveaux cas ont été détectés pendant cette période (cas 7 et 8) (figure 1) au mois de juin et d'août, après la mise en place des mesures. Le cas 7 avait été hospitalisé en réanimation du 8 mars au 3 juin en même temps que les cas 2, 3 et 4. Après sa sortie, le patient était revenu en consultation le 17 juin et avait été dépisté à cette occasion. Le cas 8, hospitalisé au 4^{ème} étage en janvier, en même temps que le cas index, a été réadmis le 28 juillet dans le secteur des patients contacts au 4^{ème} étage où tous les patients avaient un dépistage négatif. Le patient a été dépisté à l'admission puis transféré dans le secteur des cas dès la détection de la KpVIM dans son écouvillonnage. Il a probablement acquis cette souche pendant son séjour au mois de janvier.

VI- Analyse statistique

Au total, 277 sur les 324 patients contacts (85%) ont été dépistés (figure 2). Le taux d'attaque des cas secondaires (n=7) parmi les contacts dépistés (n=277) était de 2,5%.

Le taux d'attaque des cas secondaires était significativement plus important chez les patients ayant une transplantation hépatique (6 sur 45 soit 1,3%) comparés aux patients non transplantés (1 sur 230 soit 0,4%) ($p < 0,0001$). Le lieu d'acquisition semble être pour 3 des 7 cas le secteur aigu, et la réanimation pour les 4 autres. Le secteur d'hospitalisation ne ressortait pas comme un facteur de risque, les taux d'attaque étant respectivement pour la réanimation et les secteurs d'aigu, 1,2% (4/325) et 0,6% (3/375) ($p=0,4$).

VII- Coût de la campagne de dépistage

Le coût de la campagne, estimé en prenant en compte le coût de deux médecins senior, un interne en médecine, le téléphone, les courriers et les dépistages, était de 18830 Euros soit 190 Euros par patient. Le coût

annuel des dépistages pour recherche d'entérobactéries productrices de BLSE pour tout le service de chirurgie (81), maintenus, jusqu'à ce jour est d'environ 60000 Euros.

VIII- Discussion

L'émergence et la dissémination des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (EPC) deviennent un problème de santé qui touche l'ensemble des continents. Nous avons décrit le premier contrôle d'une épidémie d'une souche productrice d'une carbapénémase de type VIM dans un pays où la prévalence de ces souches est faible.

Les mesures préconisées pour la maîtrise de la dissémination des bactéries multirésistantes dans les hôpitaux (74) nous ont probablement permis de contenir notre épidémie à 7 cas secondaires mais ont été insuffisantes pour arrêter les transmissions.

Lors de l'application des mesures de contrôle de la deuxième période, nous avons dû faire face à plusieurs difficultés :

- Réorganisation du mode de fonctionnement du service, habituellement les patients de chirurgie étaient hospitalisés au 3^{ème} étage et les patients d'hépatologie au 4^{ème} étage ;
- Obtention de personnel supplémentaire ;
- Gestion des entrants ;
- Sentiment de culpabilité du personnel ;
- Difficultés liées aux traitements des infections ;
- Pérennisation des mesures ;
- Information des patients.

Ces mesures, bien que contraignantes, ont prouvé leur efficacité dans le contrôle des épidémies. Ces mesures complétées par des mesures visant à identifier les patients ayant des facteurs de risque d'être porteur d'EPC (patient transféré ou ayant des antécédents

d'hospitalisation à l'étranger), permettent le plus souvent de limiter le risque de dissémination des EPC. La difficulté est de pérenniser leur application. Ceci n'est possible qu'en assurant de façon régulière des formations aux personnels soignant.

Dès 2004, après une concertation entre l'équipe soignante et l'EOH, nous avons décidé de mettre en place des mesures nous permettant de prévenir de nouvelles épidémies. Le fondement de cette réflexion reposait sur (i) le nombre important de patients venant de l'étranger (20 % du recrutement), en particulier de Grèce où de nombreux hôpitaux étaient confrontés à des épidémies d'entérobactéries productrices de carbapénémases (107) (ii) l'activité importante de transplantation hépatique (130 par an) cette dernière étant ressortie comme facteur de risque parmi nos cas.

Ces mesures ont consisté en la mise en place, dès l'admission et pendant tout le séjour pour tout patient venant de l'étranger, d'une hospitalisation en chambre seule, de précautions de type « contact » (surblouse avant d'entrer dans la chambre, utilisation de gants pour les soins contaminants, utilisation renforcée des solutions hydro-alcooliques), d'un dépistage systématique à l'admission et une fois par semaine. De plus il a été décidé d'appliquer le dépistage à l'admission et chaque semaine à tous les patients hospitalisés dans le service. Grâce à ces mesures préventives depuis 2004 nous avons signalé 5 épisodes impliquant des EPC, tous en lien avec un séjour à l'étranger. Un épisode à engendré une épidémie (dont les circonstances sont détaillées dans le 2^{ème} article de cette thèse), qui a été rapidement contrôlée par les mêmes mesures que nous avons appliquées pour la première épidémie.

Il ne s'agit pas d'une étude randomisée permettant de faire la corrélation entre intervention et résultats. On constate cependant que, dès la mise en place de mesures plus drastiques, pendant la deuxième période, aucun cas secondaire n'a été détecté.

Publication N°2

Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital.

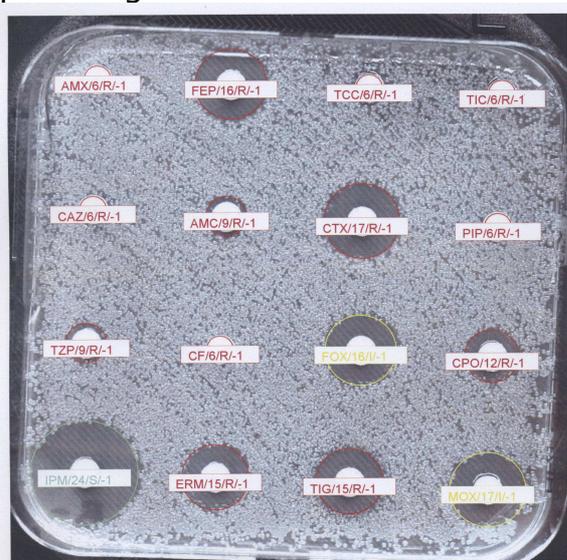
Najiby Kassis-Chikhani, Dominique Decré, Philippe Ichai, Christian Sengelin, Delphine Geneste, Liliana Mihaila, Elisabeth Dussaix and
Guillaume Arlet

J Antimicrob Chemother. 2010 Jul;65(7):1539-40

Dans cette partie, je décris l'épidémie due à la souche de *K. pneumoniae* productrice d'une carbapénémase de type KPC.

En aout 2009, un patient grec ayant des antécédents d'hospitalisation en Grèce a été hospitalisé pendant 5 jours dans le service de chirurgie digestive de l'hôpital Paul Brousse. Depuis 2004, ont été mises en place une procédure de dépistage systématique de tous les patients à l'admission puis une fois par semaine et pour tout patient venant de l'étranger, des mesures d'hygiène de type de précautions « contact » dès l'admission et pendant tout le séjour du patient. Le dépistage de ce patient grec, réalisé à l'admission était négatif. En revanche le dépistage hebdomadaire réalisé 3 jours plus tard montre la présence d'une *K. pneumoniae* dont l'antibiogramme est le suivant (figure 1) :

Figure 1 : Antibiogramme de la souche de *K. pneumoniae* isolée chez le patient grec.



- Amx : amoxicilline
- FEP : céfépime
- TCC : ticarcilline + acide clavulanique
- TIC : ticarcilline
- CAZ : ceftazidime
- AMC : amoxicilline + acide clavulanique
- CTX : céfotaxime
- PIP : pipéracilline
- TZP : pipéracilline+tazobactam
- CF : céfalotine
- FOX : céfoxitine
- CPO : cefpirome
- IPM : imipénème
- ERM : ertapénème
- TIG : tigécycline
- MOX : moxalactame



- NA : acide nalidixique
- OFX : ofloxacine
- NOR : norfloxacine
- CIP : ciprofloxacine
- GM : gentamicine
- TM : tobramicine
- AN : amikacine
- NET : netilmicine
- SXT : cotrimoxazole

Le diamètre d'inhibition pour imipénème était de 24 mm correspondant à un diamètre « sensible » selon les critères du CASFM (64). Cette souche a été interprétée comme « *K. pneumoniae* productrice d'une BLSE ».

Ce patient, durant son hospitalisation, avait été transféré quelques heures pour duodéoscopie dans hôpital voisin du nôtre.

Au mois de septembre 2009, une souche de *K. pneumoniae* multirésistante avec un diamètre pour imipénème de 21 mm est isolée de prélèvements cliniques de trois patients n'ayant pas quitté la France depuis plus d'un an et n'ayant pas, pour deux d'entre eux, été hospitalisés récemment (figure 2). Les dépistages systématiques de ces patients étaient négatifs.

L'enquête épidémiologique a permis d'établir un lien entre deux de ces patients et le patient grec. En effet, ces deux patients avaient eu une duodéoscopie avec le même appareil que ce patient grec. La souche de *K. pneumoniae* a également été retrouvée sur le duodéoscope. Pour le troisième patient, il s'agit probablement d'une transmission croisée alors que les deux premiers cas n'étaient pas encore connus.

Rétrospectivement, nous avons recherché le gène *bla_{KPC}* dans toutes les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE isolées de prélèvements cliniques ou de dépistages du service dans les 6 mois précédents. Seule la souche du patient grec était positive.

Pendant son séjour au mois d'août, nous n'avons pas retrouvé de cas secondaire.

Cette souche de *K. pneumoniae* a été à l'origine d'une épidémie dans l'hôpital où a été pratiquée la duodéoscopie et dans d'autres hôpitaux (42, 178).

Figure 2 : Antibiogramme de la souche de *K. pneumoniae* retrouvée au mois de septembre 2009.



Amx : amoxicilline
 FEP : céfépime
 TCC : ticarcilline + acide clavulanique
 TIC : ticarcilline
 CAZ : ceftazidime
 AMC : amoxicilline + acide clavulanique
 CTX : céfotaxime
 PIP : pipéracilline
 TZP : tazocilline
 CF : céfalotine
 FOX : céfoxitine
 CPO : cefpirome
 IPM : imipénème
 ERM : ertapénème
 TIG : tigécycline
 MOX : moxalactame

Des tests complémentaires ont été réalisés :

- les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode du Etest de l'ertapénème, et de l'imipénème étaient respectivement de 8 mg/l et de 2 mg/l avec la présence de microcolonies dans la zone d'inhibition de l'imipénème (figure 3).

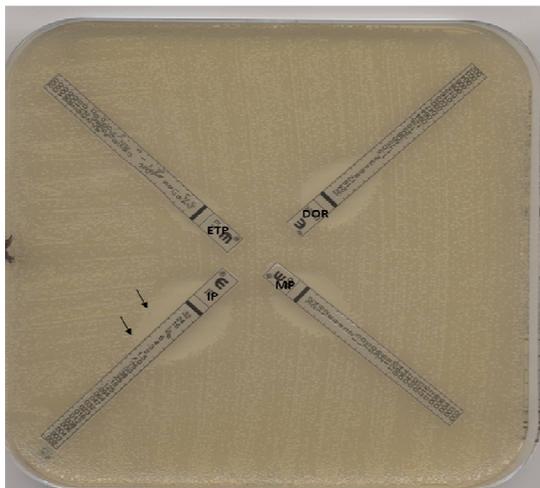


Figure 3 :

Détermination de CMI par la méthode du Etest.
 Présence de micro-colonies dans la zone d'inhibition de l'imipénème.

ETP : ertapénème
 DOR : doripénème
 IP : imipénème
 MP : méropénème

- test à l'EDTA : deux disques d'ertapénème et d'imipénème sont disposés sur une gélose ensemencée de la souche à tester. Un

disque de chacune des molécules d'antibiotiques est imprégné de 4 μ l d'EDTA 0,5M pH8. Le test est considéré comme positif si on observe une différence de 5 mm entre les disques avec ou sans EDTA. Ce test était négatif pour cette souche, excluant donc une métallo- β -lactamase (155).

- test de Hodge (figure 4): un disque d'imipénème est déposé au centre d'une boîte de Mueller Hinton (MH) préalablement ensemencé avec une souche d'E.coli de phénotype sauvage aux β -lactamines. Les souches à tester sont appliquées sur la gélose sous forme d'une strie partant du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte. La boîte est incubée 18h à 37°C. Le test est positif si on observe une déformation à l'intersection entre la strie de la souche et le diamètre d'inhibition. Cette méthode permet de mettre en évidence une hydrolyse de l'imipénème par un mécanisme enzymatique (155). Ce test était positif pour la souche testée.

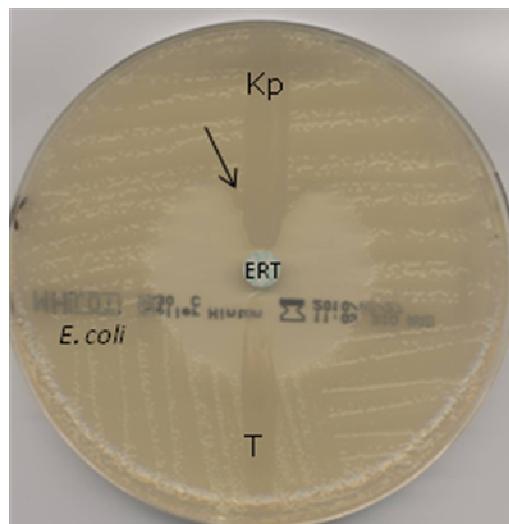


Figure 4: Test de Hodge

- test à l'acide boronique : il consiste à mettre en évidence une synergie entre un disque d'ertapénème et un disque imprégné d'acide boronique appliqués sur une boîte de MH ensemencée de la souche à tester. L'acide boronique est un inhibiteur des

céphalosporinases de classe C et des carbapénémases de type KPC (87). Ce test était positif pour la souche.

La comparaison génotypique des souches par ERIC-PCR, *Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR* (264), a montré le même profil pour toutes les souches (figure 5).

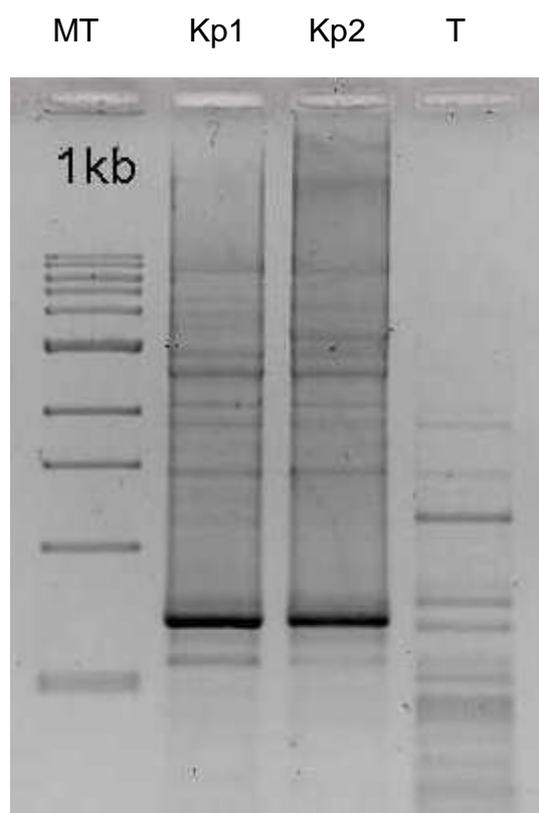


Figure 5 :

Comparaison génotypique de deux souches de l'épidémie (Kp1 et Kp2) et d'une souche témoin (T) non reliée par la technique d'ERIC-PCR.

La détection des gènes codant les β -lactamases présentes dans cette souche a été réalisée au moyen de PCR multiplex contenant trois panel d'amorces permettant de détecter les enzymes de type AmpCs, OXA, BLSE, et des PCR permettant de détecter les enzymes KPC et VIM (76). Les produits de ces PCR ont été purifiés et séquencés. Ils contenaient tous, les gènes *bla_{KPC-2}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{TEM-1}*, et *bla_{OXA-9}*.

L'analyse des souches par multilocus sequence typing (MLST) (85) a montré que toutes les souches appartenaient au sequence type (ST) 258 ayant diffusé dans le monde et en particulier en Grèce (115).

L'analyse du contenu plasmidique par la méthode de lyse alcaline (137) dans les souches parentales a montré la présence de 3 plasmides, $p1 > 130$ kb, $20 \text{ kb} < p2 < 54$ kb, $p3 < 20$ kb (figure 6). Le transfert de la résistance aux carbapénèmes a été obtenu par électroporation dans *E. coli* DH10B. Seul le plasmide p2, portant les gènes *bla*_{KPC} et *bla*_{SHV-12}, a été transféré. Les gènes *bla*_{TEM-1} et *bla*_{OXA-9} n'ont pas été retrouvés.

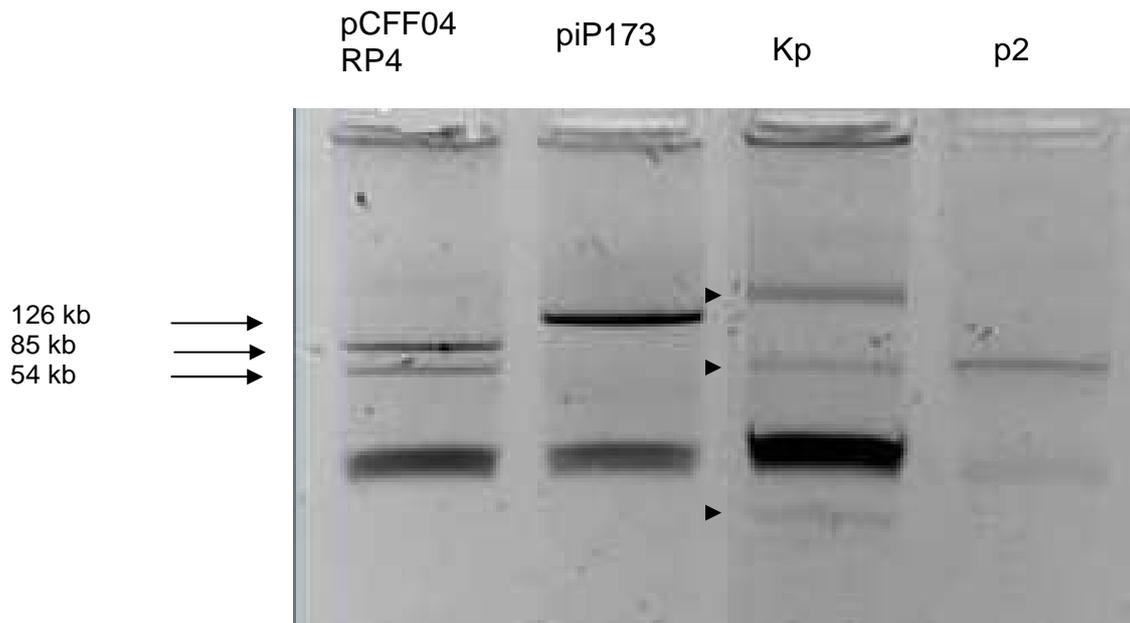


Figure 6 : Extraction plasmidique par la méthode de lyse alcaline: souche parentale avec 3 plasmides indiqués par des flèches noires ($p1 > 130$ kb, $20 \text{ kb} < p2 < 54$ kb, $p3 < 20$ kb)

L'analyse du plasmide portant *bla*_{KPC-2} par la méthode de PCR replicon typing de Carattoli (38) n'a pas permis d'identifier le groupe d'incompatibilité du plasmide alors que dans la souche parentale, il y avait un autre plasmide appartenant au groupe IncFII.

Toutefois, le séquençage complet du plasmide portant *bla*_{KPC-2} et *bla*_{SHV-12} que nous avons réalisé récemment montre qu'il appartient au groupe d'incompatibilité IncX (voir article N° 5).

Ces résultats font discuter plusieurs points :

- Le manque de sensibilité des tests de dépistage par écouvillonnage rectal et la nécessité de former le personnel infirmier et des laboratoires à la notion de prélèvement de bonne qualité. Une des méthodes pour augmenter la sensibilité des tests serait de pratiquer systématiquement une mise en culture des prélèvements après un enrichissement préalable dans un bouillon sélectif. Il s'agit cependant d'une méthode plus lourde et plus longue.
- La difficulté de mettre en évidence la production de KPC par certaines souches car le niveau d'expression de la résistance est variable. L'ertapénème a été proposé comme étant la molécule la plus adaptée (5), cependant, chez *Klebsiella* spp. d'autres mécanismes de résistance à l'ertapénème, en particulier l'imperméabilité, peuvent s'ajouter.
- Les tests phénotypiques sont une aide au diagnostic mais seule la biologie moléculaire permet d'identifier de façon sûre le mécanisme de résistance.
- L'émergence de plus en plus fréquente de souches de *K. pneumoniae* productrices de plusieurs β -lactamases en général associées à des résistances à d'autres familles d'antibiotiques, (fluoroquinolone, aminosides, cotrimoxazole) conduit à une véritable impasse thérapeutique.

Les difficultés diagnostiques et thérapeutiques, le nombre important de patients ayant été hospitalisés dans des zones connues à forte prévalence de carbapénémases, nous avaient conduit depuis 2004 à mettre en œuvre les mesures d'hygiène préventives chez tous patients venant de l'étranger (dépistage et précautions de type « contact » à l'admission).

La souche responsable de l'épidémie appartenait au clone ST258 responsable d'épidémie en Israël, aux Etats-Unis, en Grèce et d'autre pays d'Europe, au Moyen Orient, en Amérique du Sud, et en Chine (1, 34, 141, 151,153, 154, 177, 251, 177). Comme pour la plupart des souches

appartenant à ce clone, seules la colistine et la gentamicine (parfois l'amikacine) restent sensibles et les seules options thérapeutiques.

Publication N°3

**Occurrence of virulence factors, high pathogenicity island and
ICE*kp1* in clinical isolates of multi-drug resistant *Klebsiella
pneumoniae***

(Manuscrit en cours de préparation)

A la suite de ces deux épidémies qui ont mis en avant la notion de clone épidémique, nous avons voulu entreprendre un travail sur le lien éventuel entre gènes de virulence et résistance. Ce travail a porté sur l'étude de 73 souches de *K. pneumoniae* multirésistantes.

Dans cette partie du travail, est présentée l'étude des gènes de virulence d'une collection de 73 souches de *K. pneumoniae* multirésistantes isolées de prélèvements cliniques recueillis entre 1987 et 2009. Ces souches proviennent pour 53 d'entre elles de France et pour les 20 autres de différentes régions géographiques : Afrique (14), Europe (6) et Asie (2). Aucun de ces prélèvements cliniques ne provenait d'abcès hépatiques. Ces souches n'étaient pas reliées génétiquement entre elles (REP-PCR et/ou électrophorèse en champ pulsé).

L'objectif de cette étude était de rechercher :

- Les gènes de virulence,
- La présence d'un îlot de pathogénicité (HPI),
- La présence d'éléments de conjugaison et d'intégration (ICEKp1).

Sur les 73 souches étudiées :

- 48 étaient productrices d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE), dont 23 de type CTX-M,
- 15 étaient productrices d'une β -lactamase de type céphalosporinase (10 de type DHA-1, 2 de type ACC-1, 2 de type CMY-4, 1 de type FOX-3),
- 6 étaient productrices d'une β -lactamase de type BLSE et d'une céphalosporinase,
- 4 étaient productrices d'une β -lactamase de type carbapénémase : 2 KPC-2, une VIM-1 et une VIM-4,
- 36 des 73 souches avaient plus d'une β -lactamase.

Sept des 73 souches ont été responsables d'épidémie dont 4 en France :

2 souches productrices de β -lactamase de type KPC, 2 productrices de VIM, 1 productrice de SHV-12, 1 souche productrice de SHV-4 et 1 souche productrice une d'ACC-1.

Les gènes de virulence suivants ont été étudiés (Tableau 1 de l'article) :

- *magA* décrit en 2004 par Fang *et al.* (96) et retrouvé dans des souches isolées d'abcès hépatiques. Il appartient à un cluster de gènes localisé dans l'opéron capsulaire et est spécifique du sérotype K1,
- K1 et K2 (241) considérés comme les sérotypes les plus virulents,
- *rmpA* (*regulator of the mucoid phenotype*) décrit par Nassif *et al.* en 1989 (181) dont la présence est corrélée au phénotype hypermuqueux et à la virulence,
- *mrkD*, codant une adhésine appartenant aux fimbriae de type 3 facilitant l'adhésion entre les bactéries et la membrane basale des tissus humains,
- les gènes codant des systèmes de captation du fer : *fyuA* (codant un récepteur membranaire de la yersiniabactine), *ybtS* (codant la synthèse de la yersiniabactine), *entB* (codant le sidérophore de l'entérobactine), *iroN* et *iroD* (codant des récepteurs et des sidérophores), *kfu* (codant un système de captation du fer) souvent présent dans les souches d'abcès hépatique,
- *allS*, activateur de l'expression du régulon de l'allantoïne, très fréquent dans les souches responsables d'abcès hépatique,
- *VirB1*, codant la protéine VirB1 appartenant au système de sécrétion de type IV.

La présence d'un ICEKp1 (figure 1), décrit par (159), a été analysée par PCR en utilisant des amorces spécifiques (tableau1) pour les gènes *fyuA* (région 5'), *iroN* et *iroD* (région moyenne) et *virB1* (région 3').

Toutes les souches portaient le gène *entB*, 70 portaient *mrkD* (96 %), 72 (98%) *kfu*, 33 (45%) *ybtS*, 31 (42%) *virB1* et 32 (44%) *fyuA*. Trente souches (41%) portaient simultanément *virB1* et *fyuA*. Aucune souche ne portait les gènes *iroN*, *iroD* et *allS*. Deux souches portaient le gène *fyuA* mais pas *virB1* et une souche portait le gène *virB1* mais pas de *fyuA*.

Seule une souche appartenait au sérotype capsulaire K1 (gène *magA* positif) et, 6 (8 %) des souches appartenait au sérotype capsulaire K2. Une souche portait le gène *rmpA* et cette souche n'était ni de sérotype K1 ni de sérotype K2.

Parmi les 73 souches, 31 (42%) avaient un îlot de pathogénicité défini par la présence à la fois des gènes *ybtS* et *fyuA* (43) (figure 1), une souche portait uniquement le gène *fyuA*. Ceci suggère que cette souche aurait une délétion d'une partie de l'îlot de pathogénicité (Tableau 2).

Trente souches (41%) sur les 73 portaient à la fois les gènes *fyuA* et *virB1* ; toutes ces souches portaient également le gène *entB* et *mrkD*, 29 (97%) *ybtS*, 6 (20%) *kfu*. En revanche, aucune ne portait les gènes *IroN* et *IroD*. Toute la partie moyenne de l'ICE n'existerait pas dans ces souches. Pour confirmer cette hypothèse nous avons réalisé deux PCR utilisant des amorces encadrant la région située à gauche de la partie moyenne (figure 1), *viB1-F* inverse / *orf16-F* et *virB1-F* inverse / *HPI3'-F*. Les résultats obtenus sont bien en faveur de cette hypothèse: toutes les souches étaient négatives pour la première PCR et positives pour la deuxième. Nous considérons soit comme Lin TL *et al.* que nos souches possèdent un ICE avec une délétion de la partie médiane, soit que nos souches possèdent un îlot de pathogénicité et un système de sécrétion de type IV sans ICE. Pour répondre à cette question, il nous faudrait amplifier cette région par PCR mapping et analyser les séquences des produits de PCR obtenus.

Pour les 32 souches possédant un îlot de pathogénicité, nous avons retrouvé le site d'insertion au niveau du gène codant l'ARNt de l'asparagine (*asn*) pour 20 souches, 4 au niveau de l'*asn1*, 6 au niveau de l'*asn2* et 10 au niveau de l'*asn3*.

Une des souches étudiées (S1) de sérotype K1, portait des gènes impliqués dans la virulence (*entB*, *mrkD*, *kfu*) mais pas d'îlot de pathogénicité ni de sidérophores (*fyuA*, *ybtS*, *iroN*, *iroD*).

Parmi les 7 souches responsables d'épidémies, nous avons retrouvé pour 3 d'entre elles (S2, S13, S14) un îlot de pathogénicité (3/7, 43%) associé

à un système de sécrétion de type IV. Parmi ces 3 souches, 2 sont productrices de β -lactamase de type VIM et l'autre d'une céphalosporinase de type ACC-1.

Nous n'avons retrouvé aucun lien entre la présence de l'îlot de pathogénicité, *ICEkp1* et le type de β -lactamase et du réplicon porteur de ces gènes de résistance.

Dans la littérature, deux études ont recherché l'îlot de pathogénicité dans des collections de *K. pneumoniae*. D'une part Lin TL *et al.* qui ont étudié 42 souches issues d'abcès hépatiques et 32 issues de prélèvements cliniques autres, et d'autre part Koczura *et al.*(146), qui ont étudié 34 souches issues de prélèvements cliniques ne provenant pas d'abcès hépatiques. Nous pouvons comparer nos résultats avec ces souches cliniques, hors abcès hépatiques. La prévalence des îlots de pathogénicité est plus importante dans notre collection, 42% (32/73), que celles de Koczura *et al.* et de Lin TL *et al.*, respectivement 17% (6/34) et 15% (5/32). Notre collection concerne des souches multirésistantes, en revanche, nous ne connaissons pas la sensibilité des souches des deux autres études. Néanmoins, nous pouvons affirmer que notre collection de souches multirésistantes héberge des clones assez virulents. Il est à noter que dans la collection d'abcès hépatiques de Lin TL *et al.*, (impliquant habituellement des souches de phénotype sauvage), la prévalence d'îlot de pathogénicité est très élevée, 90% (38/42).

Nous démontrons donc une forte prévalence de cet îlot de pathogénicité au sein de cette collection. Nous démontrons que cet îlot est intégré sur le chromosome chez 20 souches sur les 33 qui le possède. Il nous reste à montrer que cet îlot fait partie d'un ICE par une PCR nichée montrant qu'il existe une forme circulaire de cet îlot de pathogénicité. Dans un second temps, il faudrait montrer que cet îlot est conjugatif ou capable de mobiliser un plasmide de résistance mobilisable et dépourvu du système de transfert conjugatif (280). Dans notre situation il serait préférable de démontrer directement la capacité de transfert de cet îlot.

Figure 1 : représentation schématique de l'ICE de *K. pneumoniae*. Les flèches noires indiquent les amorces utilisées

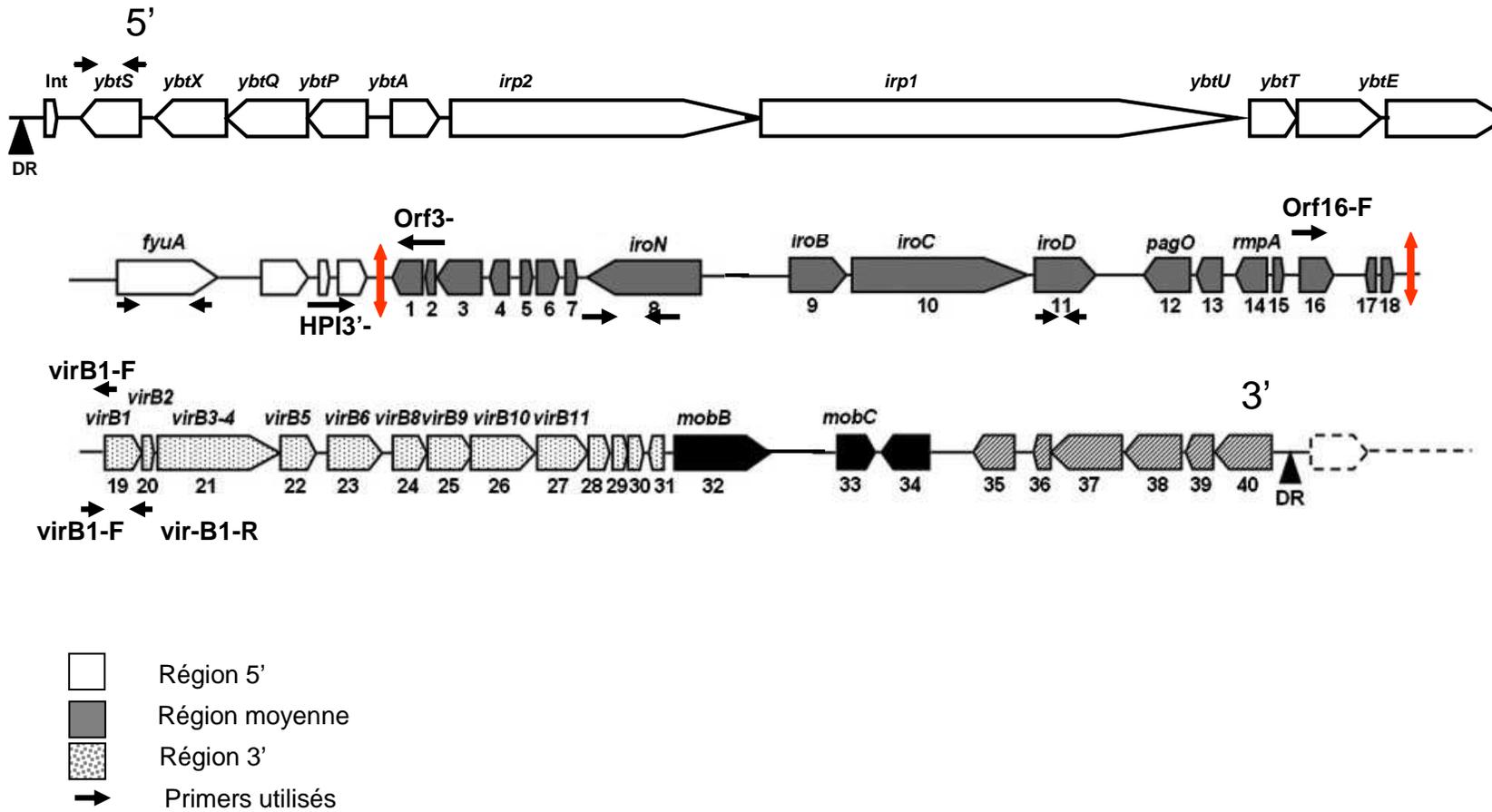


Tableau 1: Sequences of primers used in this study.

Primer	DNA sequence (5'→3')	Target	Reference
magA2_for	5'- ATCTTTTCCTTGGTGCTTCA -3'	Capsular serotype K1 and	This study
magA2_rev	5'- CAATAACTACACTTTCCGTAT -3'	hypermucoviscosity phenotype	
rmpA_for	5'-CATAAGAGTATTGGTTGACAG3'	Regulator of mucoid phenotype	This study
rpmA_rev	5'- GGTTTACAATTCGGCTAAC -3'	A	
kfu_for	5'- AGAACCTTCCTCGCTGAACA -3'	Iron transport and	This study
Kfu_rev	5'- ATAGTAGGCGAGCACCCGAGA -3'	phosphotranferase function	
entB_for	5'- CGCCAGCCGAAAGAGCAGA -3'	Siderophore	This study
entB_rev	5'- CATCGGCACCGAATCCAGAC -3'		
allS2_for	5'- TCAAGAGCAGCGAAAAACT -3'	Allantoin metabolism	This study
allS2_rev	5'- CCAATCGCCAGGGAGAAGTC -3'		
ybtS_for	5'- GACGGAAACAGCACGGTAAA -3'	Siderophore	This study
ybtS_rev	5'- GAGCATAATAAGGCGAAAGA -3'		
mrKDcf2_for	5'- CCACCAACTATTCCTCGAA -3'	Adhesine type 3 fimbriae	This study
mrKDcf2_rev	5'- ATGGAACCCACATCGACATT -3'		
iroN_for	5'- GCATAGGCGGATACGAACAT-3'	Catecholate-type siderophore	This study
iroN_rev	5'- CACAGGGCAATTGCTTACCT -3'		
iroD-for	5'-GTCCGGCGGTAACCTTCAGCC-3'	Catecholate-type siderophore	159
iroD rev	5'-TCAGAATGATGCGGTGACAC-3'		
k2A_for	5'- CCATGGTGGTTCGATTAG -3'	K2 capsule-associated gene	256
k2A_rev	5'- TGGTAGCCATATCCCTTTGG -3'		
K1	5'- GGTGCTCTTTACATCATTGC-3'	K1 capsule associated gene	256
	5'- GCAATGGCCATTTGCGTTAG- 3'		
virB1-F	5'-ATGCTTTCCACCACAGC-3'	Type IV secretion system	159
virB1-R	5'-TTATTCCTCCTCCTCAC-3'		
fyuA-F	5'- ATGAAAATGACACGGCT -3'	Membrane receptor of the	159
fyuA-R	5'- TCAGAAGAAATCAATTC -3'	yersiniabactin	
HPI 3'-F	5'-CTGCGGTAATAAATGACG-3'	Connection of 5' and 3' regions	159.
virB1-F inverse	5'-GCTGTGGTGGAAAGCAT-3'		
virB1-F inverse	5'-GCTGTGGTGGAAAGCAT-3	Right junction of middle region	159
orf16-F	5'-AATGTTCTCTGCCCATGG-3'		
asn1-F	5'-GTAGACGTGAGAATGGCCTG-3'	ICE integration site analysis	159
asn1-R	5'-GACAGGCTGTTTTTCAGCATC-3'		
Asn2-F	5'-CTGGGAGTATGATGCACTGG-3'	ICE integration site analysis	159
Asn2-R	5'-GGTTAATGATCGGCCATTGC-3'		
Asn4-F	5'-GTCGCTGTCGTGGACTTTAC-3'	ICE integration site analysis	159
Asn4-R	5'-AGTGATCCTGATGTCGCTGG-3'		
Asn3-F	5'-AAGATACGACTCCACAGC-3'	ICE integration site analysis	159
ybtS-R inverse	5'-GCTGTGGTGGAAAGCAT-3'	ICE integration site analysis	159

Tableau 2: Characteristics of the 33 strains harbouring *virB1* and / or *fyuA*

Strains	ICE integration site	Geographical origin	Date of isolation	Acquired β -lactamases	Replicon type	entB	YbtS	magA	kfu	sérotype	<i>virB1</i>	<i>fyuA</i>
S19	asn1	France	2002	CTX-M-15, DHA-1, OXA-1	N, L/M, FII, FIik	+	+	-	-		+	+
S2	asn1	Tunisia	1999	ACC-1, TEM-1	A/C	+	+	-	-		+	+
S42	asn1	France	2006	SHV-2a	FIik	+	+	-	-		+	+
S66	asn1	France	2006	DHA-1	L/M	+	+	-	-		+	+
S1	asn2	Sueden	1998	SHV-5, CMY-4, TEM-1	A/C	+	-	+	+	K1	+	-
S10	asn2	Tunisia	2004	ACC-1, TEM-1	A/C, Zk	+	+	-	-		+	+
S15	asn2	India	2004	GES-9	R, U	+	+	-	+		+	+
S21	asn2	France	2003	TEM-3	A/C, Zk	+	+	-	+		+	+
S24	asn2	France	2006	TEM-3	A/C, FIik, Zk	+	+	-	-		+	+
S46	asn2	Algeria	2004	CTX-M-15, TEM-1	L/M, FIik	+	+	-	-		+	+
S49	asn2	Algeria	2005	CTX-M15, TEM-1	L/M, I	+	+	-	-		+	+
S14	asn3	Tunisia	2005	CTX-M-15, CMY-4, VIM-4, TEM-1	A/C, FIik, R	+	+	-	+		+	+
S20	asn3	Mali	2002	CTX-M-15, SHV-2a, TEM-1, OXA-1	L/M, FII, V	+	+	-	-		+	+
S30	asn3	France	2002	DHA-1, OXA-1	FIik, R	+	-	-	-		+	+
S31	asn3	France	1999	DHA-1	A/C	+	+	-	-		+	+
S39	asn3	France	2004	SHV-5	A/C	+	+	-	-		+	+
S47	asn3	Algeria	2005	CTX-M-3, TEM-1	L/M, HI1, HI2	+	+	-	-		+	+
S51	asn3	Tunisia	2000	SHV-12	FIik	+	+	-	-		+	+
S71	asn3	France	2004	SHV-5	A/C, R	+	+	-	-		+	+
S73	asn3	France	2005	SHV-4	A/C, FIik	+	+	-	-		+	+
S88	asn3	France	2007	SHV-2a	HI1, HI2, FIik	+	+	-	-		+	+
S3	unknown	Italy	1994	FOX-3	A/C, FIik	+	+	-	+		+	+
S13	unknown	Greece	2003	VIM-1, SHV-5	A/C, FIik	+	+	-	+	K2	+	+
S16	unknown	France	2004	CTX-M-3	L/M, FII, R	+	+	-	-		+	+
S17	unknown	France	2001	CTX-M-14	N	+	+	-	-		-	+
S22	unknown	France	2005	CMT, TEM-1	FIik, R	+	+	-	-		+	+
S23	unknown	France	2005	CTX-M-3	A/C, Zk, N	+	+	-	-		+	+
S33	unknown	France	2002	DHA-1	FIik	+	+	-	-		+	+
S43	unknown	France	2005	CTX-M-3	N	+	+	-	-		-	+
S60	unknown	France	2008	SHV-2	FIik	+	+	-	+		+	+
S61	unknown	France	2007	CTX-M-15, OXA-1	FII	+	+	-	-		+	+
S62	unknown	France	2008	DHA-1, TEM-1	L/M, N, V	+	+	-	-		+	+
S65	unknown	Niger	2009	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	FIik, V	+	+	-	+		+	+

All strains were negative for *iroN*, *allS* and positive for *entB*. S2, S14, S13 responsible of outbreaks.

Publication N°4

Replicons and their addiction systems in *Klebsiella pneumoniae* susceptible or resistant to broad-spectrum cephalosporins and/or carbapenems

Dominique Decré, Najiby Kassis-Chikhani Sandrine Heurtebise, Delphine Geneste, Christian Sengelin, Caroline Dallenne, Julie Heysch, Charlotte Verdet, Jean-Claude Petit , Guillaume Arlet

Soumis

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'émergence et la dissémination des résistances et leur succès chez *K. pneumoniae*, nous avons entrepris l'analyse des supports génétiques présents chez cette espèce.

Les éléments génétiques mobiles, grâce à leur capacité de capture et de mobilisation de fragments d'ADN, jouent un rôle majeur dans la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques. Il existe deux types d'éléments génétiques mobiles différents : ceux qui permettent le transfert de gènes entre différentes molécules d'ADN et ceux qui permettent le transfert d'informations génétiques d'une cellule à une autre. La première catégorie correspond aux éléments génétiques mobilisés au cours de réactions de recombinaison (séquences d'insertion, transposons et cassettes des intégrons) (130). La deuxième catégorie comprend les plasmides conjugatifs et mobilisables et les éléments intégratifs conjugatifs (Integrative Conjugative Elements, ICE) (246, 279, 280).

Les plasmides (ou réplicons) sont des éléments génétiques extra-chromosomiques dont la réplication est autonome. Ils peuvent être transmis d'une cellule à une autre de manière horizontale et ne portent pas de gènes indispensables au fonctionnement de la cellule-hôte.

Les plasmides représentent les éléments clé de la dissémination: c'est sur eux que reposent les transferts génétiques et, à ce titre ils jouent un rôle majeur dans l'évolution des espèces. Ils sont impliqués à la fois dans la dissémination des gènes de résistance, des gènes de virulence mais aussi de gène codant des fonctions métaboliques diverses.

Le séquençage complet des plasmides est évidemment le moyen le plus précis pour les caractériser et permet d'obtenir des informations précieuses sur leur diversité et leurs fonctions essentielles (réplication, control, maintien, transfert). Les progrès technologiques devraient permettre, dans un avenir proche, de disposer de nombreuses séquences. Pour l'instant, une des méthodes largement utilisées pour leur caractérisation repose sur la notion d'incompatibilité. Deux plasmides qui portent le même réplicon ne peuvent coexister de manière stable dans la même bactérie : ce phénomène est l'incompatibilité plasmidique. C'est sur cette base qu'a été élaborée la classification des réplicons depuis les années 70 ; des groupes d'incompatibilité (Inc) ont été répertoriés. Une

méthodologie par PCR (PCR-replicon-typing PRTM) a été développée (38, 102, 265). Initialement, elle reposait sur 18 couples d'amorces ayant pour cible différentes séquences ciblant la réplication (*oriV*, protéines Rep), son contrôle (RNA inhibiteur, itérons) ou les systèmes de partition (*parA-parB*).

Actuellement, 27 groupes Inc, dont six IncF (FII à VII) et trois InI (I1, I γ , I2) sont répertoriés. De nouvelles amorces, décrivant de nouveaux types, ont été récemment introduites par exemple IncR ou IncU (102). Il en est de même pour des sous types plus spécifiques d'espèces, comme le groupe FIIk (265).

Une revue récente compile les données pour les entérobactéries (40).

Nous avons utilisé cette méthode pour la caractérisation d'une collection de 79 souches de *K. pneumoniae* isolées entre 1989 et 2010, de régions géographiques variée et, représentatives des mécanismes de résistance aux C3G et/ou aux carbapénèmes (Kp-R). Afin de déterminer s'il existe des réplicons résidents chez cette espèce, nous avons également appliqué la PRTM à une collection de 39 souches de *K. pneumoniae* de phénotype sauvage (résistantes uniquement aux pénicillines) (Kp-S).

143 réplicons ont été détectés dans la collection de Kp-R (1-4 plasmides par souche, moyenne 1.98). Pour seulement 6 souches, aucun réplicon n'a pu être détecté : ces souches produisaient les enzymes DHA-1, SHV-4, CTX-M-15, CTX-M-9, KPC-2 et OXA-48) (Table S1). Les réplicons FII (FII et FIIk) sont les plus fréquents (46/79 souches, 58.22%) ; ils comprennent pour la majorité (39/46) des réplicons FIIk. En revanche, les réplicons comme FIA, FIB et FIC qui sont largement présents chez *E. coli* n'ont pas été retrouvés (1 seul FIB). Le groupe IncR est (19/79 ; 24%) et est associé au groupe FII chez 15 souches. Les réplicons à large spectre d'hôte comme A/C ou L/M ont été détectés pour respectivement 23 (29.1%) et 19 (24%) des souches.

Dans la collection Kp-S, 25 réplicons ont été détectés chez 17 des 39 souches ; ce sont surtout des réplicons FIIk (16/25, 64%), ce qui

confirme la présence de réplicons résidents chez *K. pneumoniae*. Nos résultats sont en accord avec la littérature (63, 102).

Le même travail a été effectué pour les 61 transconjugants (Tc, n=55) ou électroporants (Ep, n=6). Parmi les 54 réplicons identifiés chez les 49 souches réceptrices, les groupes Inc FII (FII ou FIIk) et A/C sont prédominants, et au même niveau (17/54, 31.5%).

Les réplicons FII sont préférentiellement associés aux gènes codant les CTX-M (12/17), en particulier avec les enzymes les plus récentes comme CTX-M-15. Cinq Tc sont à la fois positifs pour les groupes FII et R. Cette observation n'est pas surprenante puisque les origines de réplifications utilisées pour définir les groupes FIIk et R sont présents sur le plasmide mosaïque pK245 (53). La présence de multiréplicons montre la difficulté de classification des plasmides uniquement sur la PRTM.

Les réplicons A/C qui sont, en nombre équivalents aux réplicons FII, portent des β -lactamases variées correspondant aux BLSE anciennes (type TEM et SHV), aux céphalosporinases acquises (types ACC, CMY) et à certaines carbapénémases (VIM-1). Ces réplicons à large spectre d'hôte sont en effet largement décrits chez les entérobactéries multirésistantes d'origine humaine et animale.

Les réplicons L/M sont moins fréquents (9/54) et associés aux enzymes DHA (n=3), CTX-M-3 (n=2) ou CTX-M-15 (n=6). Ces résultats sont également en accord avec la littérature, et il a été suggéré que le groupe L/M a joué un rôle primordial dans la diffusion de CTX-M-3 (111). À la différence des observations américaines des années 1993-2000 les gènes codant les BLSE de type SHV, notamment SHV-5, ne sont pas portés par des plasmides L/M.

Enfin, les gènes codant des carbapénémases sont portés par des réplicons comme A/C, X ou sont non typables. Toutefois, un nombre plus grand de souches mérite d'être étudié pour en tirer des conclusions.

Par ailleurs, sur cette même collection, nous avons analysé la présence de systèmes toxine/antitoxine (TA). Les TA jouent un rôle dans le maintien

ou la stabilisation d'un plasmide dans une population bactérienne. Ce sont des modules génétiques de petite taille qui s'organisent en opéron et qui codent généralement pour deux composants, un produit stable toxique et un produit instable qui inhibe directement ou indirectement le produit toxique.

Nous avons recherché 8 systèmes TA dans les 2 collections de *K. pneumoniae*. Dans la collection Kp-R, 29 TA ont été détectés ; ils correspondent à 3 des 8 TA testés : essentiellement *pemKI* (n=17) puis *hok-sok* (n=6) et *vagCD* (n=6). Comme cela a été observé chez *E. coli* (172), les TA (*pemKI* et *hok-sok*) sont presque exclusivement associés aux réplicons FII et FIIk portant les gènes codant CTX-M-15 et CTX-M-3. En revanche, le système *vagCD* est associé à divers réplicons mais jamais aux réplicons FII/FIIk.

Enfin, dans la collection Kp-S, seul le système *vagCD* (n=5) a été détecté chez les 16 souches porteuses de réplicon FIIK.

En conclusion, nos résultats montrent la forte prévalence de réplicon du groupe FII/FIIk chez *K. pneumoniae*. Leur présence chez des souches de phénotype sauvage suggère que le groupe FIIk est résident de l'espèce *K. pneumoniae*. Ces réplicons naturels, pourraient avoir acquis différents types de gènes codant des β -lactamases comme *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1} et plus récemment *bla*_{CTX-M-3/15}. Ces derniers pourraient provenir du transfert de gènes à partir des réplicons L/M sur des réplicon FIIk résidents déjà porteurs de systèmes TA.

Synopsis : Réplicons et systèmes d'addiction présents dans 2 collections (sensible et résistante) de *K. pneumoniae*.

79 souches R-C3G (ESBL, AmpC, Carbapénémases)

Souches parentales

143 réplicons (79 souches) ; 1-4 / souche
46/79 IncFII (58.22%) dont 39 IncFIIk
23/79 Inc A/C (29.1%)
19/79 IncL/M (24%)
19/79 IncR (24%)

Souches réceptrices (*E. coli*)

61 transferts (55 Tc, 6 Ep) → 54 réplicons
17/54 IncFII (31.4%) (dont 12 FIIk)
17/54 InA/C (31.4%)
9/54 IncL/M (16.6%)

29 systèmes d'addiction (Tc ou Ep)

17 *pemKI* (IncFII ou L/M) → 90% CTX-M
6 *hok-sok* (toujours avec *pemKI* et CTX-M)
6 *vagCD* (2 ESBL-SHV et *ampC*)

Collection de 39 souches de phénotype sauvage aux β-lactamines

→ 25 réplicons : 16 IncFIIk (64%)
→ 5 systèmes d'addiction (*vagCD*)

Replicons and their addiction systems in *Klebsiella pneumoniae* susceptible or resistant to broad-spectrum cephalosporins and/or carbapenems

Dominique Decré^{a,b}, Najiby Kassis-Chikhani^{b,c}, Sandrine Heurtebise^b, Delphine Geneste^b, Christian Sengelin^c, Caroline Dallenne^b, Julie Heysch^b, Charlotte Verdet^d, Jean-Claude Petit^{a,b}, Guillaume Arlet^{b,d}

^a Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service de Microbiologie, Paris, France

^b Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Faculté de Médecine, Département de Bactériologie, Paris, France

^c Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Paul Brousse, Service de Microbiologie, Villejuif, France

^d Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Service de Bactériologie, Paris, France

Corresponding author:

Dominique Decré, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine 75012 Paris.

Tel: 33 (0) 1 49 28 29 77, Fax: 33 (0) 1 49 28 24 72

Email: dominique.decre@sat.aphp.fr - dominique.decre@chusa.jussieu.fr

Running title: Replicons and addiction systems in *Klebsiella pneumoniae*

Keywords: incompatibility, replicon typing method, toxin-antitoxin systems

Abstract

We characterize the replicons and their addiction systems found in *Klebsiella pneumoniae* strains (i) producing acquired β -lactamases (R-strains) and (ii) those found in strains without acquired β -lactamases (S-strains). The first collection included 79 R-strains with various acquired β -lactamases and their transconjugants or electroporants and the second collection included 39 S-strains. PCR-based replicon typing, five plasmid protein antitoxin-regulated systems and three plasmid antisense RNA-regulated systems were sought by PCR. One hundred and forty two replicons were detected in parental R-strains. The IncFIIk (n=39) and IncFII replicons (n=7) were the most frequently detected (32.4%). The three other most frequent replicons were A/C (n= 23 – 16.2%), R (n=19 – 13.4%) and L/M (n=19 – 13.4%). Fifty three replicons were detected in 49 strains among the 61 recipient strains obtained. The IncFII group replicons (IncFII and IncFIIk), and the IncA/C replicons occurred both in 28% of the recipient strains and the IncL/M replicons in 15%. The IncA/C replicons were associated with 4 β -lactamase families but never with TEM-1, OXA-1 and CTX-M-types, which were associated to IncFII group or IncL/M replicons. Among the 39 S-strains, 25 replicons were characterized in 17 strains, including 16 replicons belonging to the FIIk group and none to the A/C or L/M groups. A total of 29 plasmid addiction systems were detected in recipient strains: 17 *pemKI*, 6 *hok-sok* and 6 *vagCD*. The addiction systems PemKI (15/17) and Hok-Sok (6/6) were almost exclusively associated to the replicons encoding the CTX-M-15 or CTX-M-3 beta-lactamases and belonging mainly to the IncFII or incFIIk groups

Introduction

Klebsiella pneumoniae is the most clinically significant Enterobacteriaceae after *Escherichia coli*. It is well known to most clinicians as a cause of community-acquired bacterial pneumonia. The vast majority of *Klebsiella* infections, however, are associated with hospitalization. *K. pneumoniae* ranks among the top ten organisms causing blood stream infection, pneumonia and other invasive infections in hospitalized patients in various countries. The increasing prevalence of multi-drug resistant *K. pneumoniae* causing nosocomial infection constitutes a major health problem. Hospital outbreaks of *K. pneumoniae* isolates are frequent, and the interhospital dissemination of multi-resistant strains has been largely reported (2, 23). *K. pneumoniae* isolates are increasingly resistant to multiple antimicrobial agents including β -lactams, aminoglycosides and quinolones. Outbreaks of extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing *K. pneumoniae* have been extensively reported worldwide (22). In addition to the TEM- or SHV- types, the CTX-M-types ESBL are becoming more prevalent in this species (9). *K. pneumoniae* may also possess transmissible plasmid-mediated AmpC-type β -lactamases such as CMY-, DHA or ACC-types (15) and finally in recent years, it has been implicated in the dissemination of enzymes able to hydrolyze carbapenem. Among them, VIM-type metallo- β -lactamase has spread in *Enterobacteriaceae*, especially in *K. pneumoniae* (16). Also, the later is also the main producer of KPC-type class A carbapenemase and class D, acquired OXA-48 carbapenem hydrolyzing enzyme (5, 20).

K. pneumoniae is often the first species identified to acquire and disseminate new encoding resistance genes. It can be considered as a distribution hub (platform) of the antibiotic resistance among *Enterobacteriaceae*. Acquired β -lactam resistance is usually plasmid mediated and accompanied by a relatively high stability of the

plasmids. The latter are easily transmitted among different members of the *Enterobacteriaceae* and, accumulation of resistance genes results in strains that contain multi-resistant plasmids.

This study aims to provide an overview of the plasmids found in *K. pneumoniae* resistant to third generation cephalosporins and/or carbapenem in comparison with susceptible strains. We characterized also the replicons carrying the acquired- β -lactamases and their addiction systems in relation with the type of β -lactamase.

Materials and Methods

Bacterial strains

Seventy nine strains of *K. pneumoniae* recovered from various geographical regions producing well characterized acquired- β -lactamases were studied (R-strains) (Table S1). There were isolated between 1987 and 2009: 54 of 79 were recovered from patients in France, the others were isolated in Africa (n= 18), Europe (n=6) and Asia (n=1). Thirty nine susceptible (S-) strains of *K. pneumoniae* (without acquired β -lactamase) were further studied: they were isolated between 2004 and 2008 in five hospitals from the Paris area and were susceptible to cefalothin (MIC \leq 8 mg/L) and to the association of amoxicillin and clavulanic acid (MIC \leq 2/2 mg/L).

On the basis of molecular typing methods such as ERIC-PCR and/or PFGE (11), all these strains were non-genetically related (data not shown).

E. coli J53-2 *rif^r* and *E. coli* DH10BTM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were used for conjugation and transformation experiments, respectively.

β -lactam resistance transfer assays

The plasmids conferring β -lactam resistance in each of the *K. pneumoniae* strains were transferred by mating with *E. coli* J53-2 *rif^r*. Transconjugants were selected on

Drigalski agar plates (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) containing rifampin (250 mg/L) and ticarcillin (125 mg/L), or cefotaxime (2.5 mg/L). When resistance plasmid transfer failed in the mating experiments or when plasmid co-transfer occurred, transformation was used: plasmid DNA was extracted by using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and then transferred into *E. coli* DH10BTM cells by electroporation. Transformants were selected on Drigalski agar plates supplemented with ticarcillin or cefotaxime as described earlier.

Detection of β -lactamase gene in transconjugants or electroporants

Template DNA preparation was performed from 3 heated colonies in a total volume of 500 μ l of distilled water (95°C for 10 min) followed by a centrifugation step of the cell suspension. PCR experiments were performed to identify β -lactamases encoding genes present in transconjugants or electroporants by use of specific primers which have been designed previously (10, 18). Subsequent sequencing of PCR products was also performed.

Plasmid replicon type determination

Plasmid replicons were determined for the parental *K. pneumoniae* R-strains and S-strains and for *E. coli* transconjugants or transformants obtained after transfer of β -lactam resistance from R-strains.

Plasmid replicons were identified using the PCR-based replicon typing scheme described by Carattoli *et al* (3). Initially, multiplex PCR were used and then redefined with single PCR used to obtain clear amplicons for sequencing. Plasmids were tested for additional targets: the *repA* gene of the pRA3 plasmid from *Aeromonas hydrophila*

(IncU) and the *repB* gene from the plasmid pK245 from *K. pneumoniae* (named IncR by Garcia-Fernandez *et al.*) (12).

Because of the heterogeneity of the FII replicons, we also used the primers CA1 and OR1 previously designed to recognize the consensus sequences in the *repA* gene and the *oriR* region of FII replicons highly similar to plasmid R100 (10, 21). Primers designed in accordance with GenBank accessible *repA* sequences from other *K. pneumoniae* plasmids were used. Two plasmids, pGSH500 and pKNP4 (accession numbers N^oAJ009980 and CP000649 respectively) that contain a *repA* gene showing \approx 78-80% of nucleotide identity with the currently known *repA* genes of the IncFII family were used to design 2 sets of primers able to detect FII related replicons from *K. pneumoniae* (named IncFIIk as also used by Coelho *et al.* and Villa *et al.*) (8, 26). Finally, the *repA* gene from 3 other plasmids from *K. pneumoniae*: pMET-1 (EU383016), pLVPK (AY378100) and pK245 (DQ449578) allowed to design additional primers respectively named IncMet, IncLVPK and IncZk (6, 7, 25). These primers and annealing temperatures used are reported in Table S2.

Plasmid addiction system determination

The following 5 plasmids protein antitoxin-regulated systems, PemK-PemI (*pemKI*) (plasmid emergency maintenance locus) of IncFII plasmids R1 and R100, CcdA-CcdB (*ccdAB*) (coupled cell division locus) of F plasmid, RelB-RelE (*relBE*) (relaxed control of stable RNA synthesis) of p307 plasmid (InFI), ParD-ParE (*parDE*) of RK2 plasmid and VapB-VapC (*vapBC*) (virulence associated protein) named also VagC-VagD (*vagCD*) system of some virulence plasmid from *Salmonella*, and the 3 plasmid antisense RNA-regulated systems, HokSok (*hok-sok*) (host-killing) system of R1 plasmid, PndA-PndC (*pndAC*) (promotion of nucleic acid degradation) of R483 plasmid (IncI1) and R16 plasmid (IncB/O) and SrnB-SrnC (*srnBC*) (stable RNA) of

IncF plasmid were sought by PCR (19). These PCR experiments were performed for the tranconjugants and electroporants. The primer sequences and annealing temperatures have been reported elsewhere (19). Specific primers able to differentiate PemK-PemI of IncF replicons (R100, accession number M26840) from those of L/M replicons (pCTX-M3, accession number AF550415) were designed as follows: pemK-F_for CGGTGTCGTTGGATGGTGTGG and pemK-F_rev GCCGCCTGTCCACTATTCT ; pemK-L/M_for ACGCCGGCTGCTTTTAAC and pemK-L/M_rev GATCGATATGAAAGCCCGC.

Results and discussion

PCR-based replicon typing in K. pneumoniae R-strains

By using the replicon typing method, 143 replicons were detected in 72 parental R-strains (mean: 1.98; range 1-4) (Table S1). The replicons could not be determined (NT) in 7 strains of the 79 (8.8%) parental *K. pneumoniae* tested. They respectively corresponded to DHA-1, SHV-4, CTX-M-15, CTX-M-9, KPC-2 and OXA-48 producers (Table S1).

The IncFII-type replicons (IncFIIk and IncFII), detected in 46 over the 79 parental R-strains (60.5%), were the most frequently replicons types detected in our collection (32.4%): they included 7 IncFII (similar to R100) and 39 IncFIIk, related from *K. pneumoniae*, named FIIk (Table 1). In the recent review of Carattoli *et al.*, FII replicons have been reported in *K. pneumoniae* (4) but seem less frequent in comparison to our results. It may be due to the lack of detection of the new IncFIIk replicons when using the Frep_B primers described by Carattoli *et al.* (3). Conversely, IncF replicons such as FIA, FIB and FIC that are widely distributed among *E. coli* strains were only detected in one strain (FIB). Our results are in accordance with the high prevalence of FIIk in *K. pneumoniae* isolates from Barcelona (8) and suggest

that this replicon is well adapted in this species. In their recent paper, Villa *et al.* compared the IncF plasmids found in *E. coli*, *Salmonella* sp. and *K. pneumoniae* (26). They also individualized the same FIIk replicon group from *K. pneumoniae* and added to their replicon typing method a new set of primers able to detect them (26).

The IncR replicons were detected in 19 parental R-strains (24%) and were associated with IncFII replicons in 15 strains (respectively with IncFIIk in 12 strains and with IncFII in 3 strains). Similar results were reported in *K. pneumoniae* isolates studied by Coelho *et al.* and also associated with FIIk replicons (8).

The two other most frequent replicons were A/C and L/M, respectively detected in 23 (29.1%) and 19 (24%) of parental R-strains. IncA/C and IncL/M have been also documented in *K. pneumoniae* (4).

The replicons IncN (n=7), IncLVPK (n=7) and IncZk (from pK245) (n=7) were detected at a level equivalent to the IncFII replicons from R100 (n=7). The plasmid pLVPK is a plasmid recovered from a virulent K2 *K. pneumoniae*, and which encoded a locus named *rmpA2*, which has been reported to enhance the colony mucoidy of various serotypes of *K. pneumoniae*. The plasmid pK245 encode the quinolone resistance gene *qnrS* and the ESBL gene *bla*_{SHV-2}.

Other replicons such as HI1-HI2 (n=3), I (n=1), P (n=1), X (n=1) or U (n=1) were encountered only for a few strains. The IncP replicon that was reported in β -lactam susceptible strains of *K. pneumoniae* (24) was detected in only one strain of our collection. Finally, the IncMet replicon from pMET, a multiresistance plasmid which encode an integrative and conjugative element (ICE_{Kp1}) involved in primary liver abscess formation was not detected (25).

PCR-based replicon typing in *K. pneumoniae* S-strains

By using the replicon typing method, 25 replicons were found in 17 strains over the 39 S- strains tested (mean 0.64) (range 0-3). The great majority of these replicons belong to the IncFIIk (16/25, 64%). The others were IncR (n=4), IncZk (n=3), FIB (n=1) and IncP (n=1). No replicon belonging to groups IncA/C, IncL/M, IncN and IncLVPK were found in this collection of S-strains. These results and those obtained for the resistant *K. pneumoniae* strains seems confirm that the IncFIIk group could correspond to a well adapted IncF plasmid in *K. pneumoniae* as suggested by Villa *et al.* (26), like IncFI or IncFII in *E. coli*.

PCR-based replicon typing in *E. coli* recipient strains

Transfer of β -lactam resistance either by conjugation or electroporation was achieved for 61/79 strains; 55 transconjugants (Tc) and 6 electroporants (Ep) were analyzed (Table S3). Once transconjugants or electroporants were obtained, the presence of the *bla* gene(s) identified in parental strain was confirmed by PCR; the replicons were determined by PCR to determine the Inc/rep type followed by direct sequencing with PCR primers. The replicons could not be determined for 11 transconjugants or transformants corresponding to various β -lactamases: SHV-2a (n=1), SHV-4 (n=1), SHV-5 (n=2), CTX-M-3 (n=1), CTX-M-15 (n=1), DHA-1 (n=1), KPC-2/SHV-12 (n=1), VIM-1 (n=1) and OXA-48 (n=2) (Table 2).

Among the 54 replicons identified in 49 recipient strains, the FII-like group and the A/C replicons were the most frequently detected in recipient strains, respectively 17/54, (31.5%) and 17/54 (31.5%). The IncFII group included 11 FIIk and 6 FII replicons. These incFII plasmids were preferentially associated with CTX-M β -lactamase genes (12 over 17) and also SHV-type (3). In their review, Caratolli *et al.* (4) underlined the fact that IncF plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-15} are frequent, especially in *E. coli*, and are not a homogenous group of plasmids suggesting that

these plasmids are evolving through replicon sequence divergence. The few reports of IncFII plasmids from *K. pneumoniae* were associated with various *bla*_{CTX-M}, or *bla*_{SHV} (4). Interestingly, we found five recipient strains bearing both IncFIIk and IncR; this association between IncR (from plasmid pK245) and IncFIIk (from pGSH500) could be due to the fact that IncR primers have been designed from *repB* gene of the plasmid pK245 which is similar to the *repB* gene from pGSH500; the later plasmid is bearing an IncFIIk *repA* gene which allowed us to design our IncFIIk primers. In our series, sequences of the IncR products showed 100% identity with the *repB* gene from pK245 while sequences of the IncFIIk were similar to the *repA* from pGSH500 and pKN4, both FII related. The pK245 plasmid possesses a mosaic structure including 2 regions respectively deriving from an IncF plasmid and from the IncQ plasmid RSF1010 (7). Moreover, in pK245, three genes encoding replication initiator proteins were found; the first have 70% AA similarity with a RepA found in pSW800 from *Pantoea stuartii* (293 AA), the second have 96% AA similarity with a RepB found in pGSH500 from *K. pneumoniae* (287 AA) and the third had 99% AA similarity with a RepE found in *E. coli* IncHI plasmid R27 (251 AA) (7). These proteins are presumably playing a role in plasmid replication since the corresponding genes are all associated with multiple iterons. Some plasmids have been reported to possess more than one replication gene that may give a better chance for them to replicate in a broader range of host (6, 7, 26).

The A/C replicons (17/54), which appear almost at a level equivalent to the IncFII group in our work carry various β -lactamase genes, SHV- and TEM-ESBLs, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases and with the exception of CTX-M group, OXA-1 and TEM-1 β -lactamases (Table 2). The broad-host-range IncA/C group of plasmids has been previously detected in multi-drug-resistant human and

animal pathogens of *Enterobacteriaceae* species including *K. pneumoniae* (4). In a study concerning 29 *Salmonella enterica* and 38 *E. coli*, Hopkins *et al.* reported that the genes *bla*_{CMY} are located on A/C plasmids (14). Plasmids belonging to the IncA/C group have recently facilitated the spread of genes conferring antibiotic resistance to β -lactams such as *bla*_{TEM-3}, *bla*_{TEM-21}, *bla*_{TEM-24}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{CTX-M-2} (4, 18). Our results on *K. pneumoniae* are in accordance with these observations.

Finally, L/M replicons are less frequent in our study (9/54) and are associated with DHA-1 (n=3) or CTX-M-3 (n=2) or CTX-M-15 (n=6) β -lactamases. In *E. coli*, it was reported that *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-3} genes are mostly found on plasmids F and L/M (14, 18). Golebiewski *et al.* have suggested that the L/M group played an important role in the dissemination of the β -lactamase CTX-M-3 (13). In our series, the CTX-M-15 enzyme is rather associated with FII replicons (4 FII and 6 FIIk) or L/M replicons (n=4) while CTX-M-3 is carried by plasmids of groups L/M (n=2), N (n=1), FII (n=1) or unknown (NT, n=1). Similar results were also observed in the collection of *E. coli* studied by Marcadé *et al.* (18). In contrast, IncL/M replicons were never detected in the collection of *K. pneumoniae* producing CTX-M-15 analyzed by Coelho *et al.* (8).

While *Klebsiella* producers of SHV-5 in the United States during the 1993-2000 period, carried the *bla*_{SHV-5} gene on IncL/M plasmids, we found *bla*_{SHV-5} gene located on A/C or NT plasmids. The *bla*_{SHV-12} gene variant that largely prevailed in *K. pneumoniae* isolates from Europe was located on plasmids from different families. Our 3 SHV-12 β -lactamases in recipient strains were respectively associated with IncN, IncFIIk and IncXk.

Finally, genes for carbapenemases reported in *K. pneumoniae* were located on various replicons (4): in our study two electroporants and five transconjugants were obtained for strains producing various genes of carbapenemases (3 VIM-1/4, 2 KPC-

2 and 2 OXA-48) and replicons could be determined for only two VIM (IncA/C) and one KPC-2 (IncX) producers (Table 2).

Plasmid addiction system determination in E. coli recipient strains.

In a total, 29 plasmid addiction systems were detected in plasmids encoding various β -lactamases. Among the eight systems tested, only three were detected: *pemKI* (n=17), *hok-sok* (n=6) and *vagCD* (n=6). Twenty one addiction systems (72%) were encoded by the plasmids bearing CTX-M-15 and the CTX-M-3 type ESBLs. These CTX-M plasmids were associated with the *pemKI* and *hok-sok* systems, respectively 15/17 and 6/6 cases. Similar observations were reported on a collection of plasmids encoding ESBLs in *E. coli* (19).

When the type of replicon was considered (Table 3), the frequency of addiction systems was highest in IncFII plasmids (6/6 for *pemKI-F* and 5/6 for *hok-sok*) followed with IncFIIk plasmids (4/11 for *pemKI-F* and 1/11 for *pemKI-L/M* and for *hok-sok*) and IncL/M plasmids (5/9 for *pemKI-L/M*). In contrast, the *vagCD* system was found in various replicons such as A/C (n=3), R (n=1), Zk (n=1) or unknown (n=1) but never associated with FII like replicons. The *vagCD* system was identified on virulence plasmids from *Salmonella* sp. and, interestingly this *vagCD* system was found in our collection on replicons bearing plasmid-mediated AmpC β -lactamases that were firstly encountered in *Salmonella* sp. (1). Finally, none of our strain harbored the *ccdAB* system. This observation is in accordance with the association of this system with FIA/FIB replicons which were not detected in our recipient strains (19).

When we analyzed the addiction systems found in the 16 susceptible *K. pneumoniae* strains which host a FIIk replicon, we found only five strains with *vagCD* and none with *pemKI* or *hok-sok*. Moreover, four S-strains without replicon were also positive with *VagCD* system; this addiction system has been previously characterized in

association with the integrative and conjugative element ICE_{Kp1} reported in virulent (and susceptible) strains (17).

In conclusion, our study contributes to a better knowledge about plasmids in *K. pneumoniae*. It confirms the high prevalence of FIIk replicons in this species and reports for the first time the detection of addiction systems. We suggest that the FIIk replicons which could be well adapted to the species *K. pneumoniae*, were able to acquire β -lactamases genes such as *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1} and more recently the *bla*_{CTX-M-3/15} group. The later could have been acquired via the L/M replicons, on resident IncFII related replicons (IncFII or IncFIIk) bearing one or two addiction systems (PemKF or Hok-sok) which could explain the persistence of these plasmids in their hosts.

Funding. This work was funded in part by the Université Pierre et Marie Curie, Paris-6, and by a grant from Assitance Publique-Hôpitaux de Paris, Contract CRC N°08007 (KPath).

Transparency declarations. Nothing to declare

References

1. **Arlet G., et al.** 2006. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect.* **8**: 1945-1954.
2. **Brisse S., et al.** 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* **4**: e4982.
3. **Carattoli A., et al.** 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol Methods.* **63**: 219-228.
4. **Carattoli A.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. 2009. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 2227-2238.
5. **Carrër A., et al.** 2010. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 1369-1373.

6. **Chen Y. T., et al.** 2006. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum- β -Lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrobial Agents Chemother.* **50**: 3861–3866.
7. **Chen Y. T., et al.** 2004. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene* **337**: 189–198.
8. **Coelho A., et al.** 2010. Characterization of the CTX-M-15 encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents* **36**: 73-78.
9. **Coque T. M., F. Baquero, and R. Canton.** 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* **13**: pii=19044.
10. **Dallenne C., A. Da Costa, D. Decré, C. Favier, and G. Arlet.** 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* **65**: 490-495.
11. **Decré D., et al.** 1998. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis.* **27**: 834-844.
12. **García-Fernández A., D. Fortini, K. Veldman, D. Mevius, and A. Carattoli.** 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother.* **63**: 274-281.
13. **Gołebiewski M., et al.** 2007. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-3}. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 3789–3795.
14. **Jacoby G. A.** 2009. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **22**: 161-182.
15. **Kassis-Chikhani N., et al.** 2006. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother.* **57**: 142-145.
16. **Hopkins K. et al.** 2006. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 3203-3206.
17. **Lin T. L, Lee C. Z, Hsieh P. F, Tsai S. F, Wang J. T.** 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J Bacteriol.* **190**: 515–526.
18. **Marcadé G., et al.** 2009. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob Chemother.* **63**: 67-71.
19. **Mnif B., et al.** 2010 Molecular characterization of addition systems of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob Chemother.* **65**: 1599-1603.
20. **Nordmann P., G. Cuzon, and T. Naas.** 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* **4**: 228-236.

21. **Osborn A. M., F. M. Da Silva Tatley, L. M. Steyn, R. W. Pickup, and J. R. Saunders.** 2000. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology*. **146**: 2267–2275.
22. **Paterson D. L., and R. Bonomo.** 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. **18**: 657-686.
23. **Podschun R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* sp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. **11**: 589-603.
24. **Shen P., Y. Jiang, Z. Zhou, J. Zhang, Y. Yu and L. Li.** 2008. Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67 850 bp multiresistance plasmid encoding *qnrA1*, *aac(60)-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-24}* from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. **62**: 1252–1256.
25. **Sherley M., M. D. Gordon, and P. J. Collignon.** 2003. Species differences in plasmid carriage in the *Enterobacteriaceae*. *Plasmid*. **49**: 79–85.
26. **Soler Bistué A. J., et al.** 2008. *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pMET1: similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements. *PLoS One*. **3**: e1800.
27. **Villa L., A. Garcia-Fernandez, D. Fortini, and A. Carattoli.** 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*. **65**: 2518-2529.

TABLE 1. Replicon types found by PCR replicon typing in the two collections of *Klebsiella pneumoniae*.

Strains			Replicon types														N total	mean
<i>K. pneumoniae</i>	n	n with replicons (%)	A/C	FII	FIK	FIB	HI1-HI2	I	L/M	N	P	R	X	U	LVPK	Zk		
Susceptible	39	17 (44%)	0	0	16 (64%)	1	0	0	0	0	1	4 (16%)	0	0	0	3 (12%)	25	0.64
Resistant	79	72 (91%)	23 (16.2%)	7	39 (27.5%)	1	3	1	19 (13.4%)	14	1	19 (13.4%)	1	1	7	7 (5.2%)	143	1.98

TABLE 2. Characterization of replicons found in recipient *E. coli*.

<i>bla</i> gene		type and number of replicons found in 61 recipient <i>E. coli</i>						
type and allele	N	A/C 17 ¹	FIK (+/-R) 11 ²	FII 6 ³	L/M 9 ⁴	N 3 ⁴	others 3 ⁵	NT 12 ⁶
SHV-ESBL	14	3	3	1	-	1	1	5
SHV-2	1	-	1	-	-	-	-	-
SHV-2a	3	-	1	1	-	-	-	1
SHV-4	2	1	-	-	-	-	-	1
SHV-5	4	2	-	-	-	-	-	2
SHV-12	4	-	1	-	-	1	1	1
TEM-ESBL	6	5	1	-	-	-	-	-
TEM-3	3	3	-	-	-	-	-	-
TEM-12	1	-	1	-	-	-	-	-
TEM-21	1	1	-	-	-	-	-	-
TEM-129	1	1	-	-	-	-	-	-
TEM-1	4	-	3	1	-	-	-	-
OXA-1	16	-	6	6	1	1	1	1
CTX-M	23	-	6	6	6	2	1	2
CTX-M-3	5	-	-	1	2	1	-	1
CTX-M-15	18	-	6	5	4	1	1	1
pAmpC	15	8	2	-	3	-	1	1
CMY-2/-4	5	5	-	-	-	-	-	-
ACC-1	2	1	1	-	-	-	-	-
DHA-1	7	1	1	-	3	-	1	1
FOX-3	1	1	-	-	-	-	-	-
Carbapenemase	7	2	-	-	-	-	-	5
VIM-1/-4	3	2	-	-	-	-	-	1
KPC-2	2	-	-	-	-	-	1	1
OXA-48	2	-	-	-	-	-	-	2

¹ One A/C replicon carried both CMY-4 and VIM-1.

² Three FIIK carried both CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, three carried both CTX-M-15 and OXA-1 and one carried SHV-2 and DHA-1.

³ One carried both CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, one carried CTX-M-15, OXA-1, SHV-2a, three carried both CTX-M-15 and OXA-1 and one carried CTX-M-3 and OXA-1.

⁴ One L/M replicon and one N replicon carried both CTX-M-15 and TEM-1.

⁵ One R replicon carried both DHA-1 and OXA-1.

⁶ One carried both CTX-M-15 and OXA-1 and one carried both SHV-12 and KPC-2.

TABLE 3. Addiction systems found in recipient *E. coli* of multiresistant strains of *K. pneumoniae*.

Inc family	N total	<i>bla</i> gene	Addiction systems		
			<i>pemKI</i> *	<i>hok-sok</i>	<i>vagCD</i>
FIIk	11		5	1	0
		CTX-M-15, OXA-1	4 (F)	1	
		SHV-12	1 (L/M)	0	
FII	6		6	5	0
		CTX-M-15, OXA-1	5 (F)	4	
		CTX-M-3, OXA-1	1 (F)	1	
A/C	17		1	0	3
		SHV-5	1 (F)		1
		ACC-1	0		1
		CMY-4	0		1
L/M	9		5	0	0
		CTX-M-15	3 (L/M)		
		CTX-M-3	2 (L/M)		
Others	14		0	0	3
R		DHA-1, OXA-1			1
Zk		SHV-12			1
NT		DHA-1			1

**pemKI* according to specific of F or L/M replicons

TABLE S1. β -lactamases and replicons present in parental strains.

Kp strain number	Geographical origin	Acquired β -lactamases	Replicon type of the parental strain
KpS27	France	SHV-2	FIIk, V
KpS42	France	SHV-2a	FIIk
KpS88	France	SHV-2a	HI1, HI2, FIIk
KpS60	France	SHV-2	FIIk
KpS9	France (outbreak)	SHV-4	NT
KpS73	France	SHV-4	A/C, FIIk
KpS37	France	SHV-5	FIIk, R
KpS39	France	SHV-5	A/C
KpS71	France	SHV-5	A/C, R
KpS26	Afganistan	SHV-12	N, FIIk, V, R
KpS51	Tunisia	SHV-12	FIIk
KpS52	Tunisia	SHV-12	FIIK, Zk, R
KpS53	Center African republicque	SHV-12	Zk
KpS21	France	TEM-3	A/C, Zk
KpS24	France	TEM-3	A/C, FIIk, Zk
KpS83	France	TEM-3	A/C, N, FIB, FIIk
KpS76	France	TEM-12	FIIk
KpS89	France	TEM-21	A/C
KpS68	France	TEM-129	A/C
KpS22	France	CMT, TEM-1	FIIk, R
KpS16	France	CTX-M-3	L/M, FII, R
KpS23	France	CTX-M-3	A/C, Zk, N
KpS36	Tunisia	CTX-M-3, OXA-1	FII, R
KpS43	France	CTX-M-3	N
KpS47	Algeria	CTX-M-3, TEM-1	L/M, HI1, HI2
KpS85	France	CTX-M-3	L/M, FIIk, R
KpS18	France	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	FII, R
KpS45	France	CTX-M-15, OXA-1	L/M, FIIk
KpS46	Algeria	CTX-M-15, TEM-1	L/M, FIIk
KpS48	Algeria	CTX-M-15, TEM-1	L/M, P
KpS49	Algeria	CTX-M15, TEM-1	L/M, I
KpS55	France	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	NT
KpS56	France	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	FIIk
KpS57	France	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	FII
KpS61	France	CTX-M-15, OXA-1	FII
KpS65	Niger	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	FIIk, V
KpS7	France	CTX-M-22, TEM-1	L/M, V
KpS75	France	CTX-M-15, OXA-1	FIIk
KpS78	France	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	L/M, FIIk
KpS79	France	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	L/M, FIIk, R
KpS80	France	CTX-M15, TEM-1, OXA-1	FIIk, R
KpS82	France	CTX-M-15, OXA-1	FII
KpS87	France	CTX-M-15, OXA-1	FIIK
KpS84	France	CTX-M-9	NT
KpS17	France	CTX-M-14	N

KpS15	India	GES-9	R, U
KpS2	Tunisia	ACC-1, TEM-1	A/C
KpS10	Tunisia	ACC-1, TEM-1	A/C, Zk
KpS3	Italy	FOX-3	A/C, FIIk
KpS8	France	CMY-2	A/C, FIIK
KpS11	France	CMY-4	A/C, R
KpS86	France	CMY-4	A/C, FIIk
KpS4	France	DHA-1	A/C
KpS5	France	DHA-1, TEM-1	L/M, FIIK, R
KpS28	France	DHA-1	L/M
KpS29	France	DHA-1	NT
KpS30	France	DHA-1, OXA-1	FIIk, R
KpS31	France	DHA-1	A/C
KpS32	France	DHA-1	Zk
KpS33	France	DHA-1	FIIk
KpS34	France	DHA-1	L/M, FIIk
KpS62	France	DHA-1, TEM-1	L/M, N, V
KpS63	France	DHA-1, TEM-1	L/M, HI2, R
KpS66	France	DHA-1	L/M
KpS6	Greece	SHV-5, MOX-2, TEM-1	A/C, FIIK
KpS1	Sueden	SHV-5, CMY-4, TEM-1	A/C
KpS72	France	SHV-2a, DHA-1, TEM-1	FIIk
KpS12	France	SHV-2, DHA-1, OXA-10	FIIk, V, R
KpS19	France	CTX-M-15, DHA-1, OXA-1 CTX-M-15, SHV-2a, TEM-1,	N, L/M, FII, FIIk
KpS20	Mali	OXA-1	L/M, FII, V
KpS25	France	CTX-M-15, ACC-1, TEM-1	A/C, FIIk
KpS38	Greece	KPC-2, SHV-5, TEM-1 KPC-2, SHV-12, TEM-1,	FIIk, R
KpS90	Greece	OXA-9	FIIk, X
KpS91	Italy	KPC-2, TEM-1 CTX-M-15, CMY-4, VIM-4,	NT
KpS14	Tunisia	TEM-1	A/C, FIIk, R
KpS13	Greece	VIM-1, SHV-5	A/C, FIIk
KpS92	Egypt	VIM-1, CTX-M-14 OXA-48, CTX-M-15, TEM-1,	L/M, A/C
KpS93	Morocco	OXA-1	NT
KpS94	Tunisia	OXA-48	NT

TABLE S2. Sequences of additional primers used for detection of replicons in this study.

Plasmid	Primer name	DNA sequence*	Target site	EMBL accession number	Amplicon size
pGSH500	FII1k_for	5'-CGCTGCTTATTTTCCCATTCC-3'	repA	AJ009980	415pb
	FII-1k_rev	5'-CGTCCCGTTTTGATTTTTCCA-3'			
pKPN4	FII-2k_for	5'-GGGCTCATCACCTATCAGACT-3'	repA	CP000649	235pb
	FII-2k_rev	5'-GAAAACGCTCACGCACAAACC-3'			
pLVPK	repApLVpk_for	5'-GTTGTGTCGTCTTTCCTCT-3'	repA	AY378100	606pb
	repApLVpk_rev	5'-GCTTCATCCAGTTGCTCTA-3'			
pMET-1	repAMET-1_for	5'-TCACCTACGGGCATCGCAA-3'	repA	EU383016	444pb
	repAMET-1_rev	5'-GAAATCCTCTGTTACCTCAAT-3'			
pK245	repZk_for	5'-TTCAAGGTATGGGTTCGGTATC-3'	repA	DQ449578	348 pb
	repZk_rev	5'-GTTTATCGGTTTATGTTCGTAGC-3'			
IncR	IncR_for	5'-TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC-3'	repB	DQ449578	251 pb
	IncR_rev	5'-GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA-3'			
IncU	IncU_for	5'-TCACGACACAAGCGCAAGGG-3'	repB	DQ401103	843 pb
	IncU_rev	5'-TCATGGTACATCTGGGCGC-3'			

*Annealing temperature of 55°C

TABLE S3. Replicons and additions systems detected in 61 recipient strains.

N°strain	Tc or Ep	β-lactamase	Replicon type of the Tc or Ep	Addition systems		
				<i>pemKI</i> *	<i>hok-sok</i>	<i>vagCD</i>
KpS88	Tc	SHV-2a	NT	-	-	-
KpS72	Tc	SHV-2a	FIIk	-	-	-
KpS9	Tc	SHV-4	NT	-	-	-
KpS73	Tc	SHV-4	A/C	-	-	-
KpS1	Tc	SHV-5	NT	-	-	-
KpS6	Tc	SHV-5	A/C	+F	-	+
KpS13	Tc	SHV-5	A/C	-	-	-
KpS38	Tc	SHV-5	NT	-	-	-
KpS26	Tc	SHV-12	N	-	-	-
KpS51	Tc	SHV-12	FIIk, R	+L/M	-	-
KpS53	Ep	SHV-12	Zk	-	-	+
KpS21	Tc	TEM-3	A/C	-	-	-
KpS24	Tc	TEM-3	A/C	-	-	-
KpS83	Tc	TEM-3	A/C	-	-	-
KpS76	Tc	TEM-12	FIIk	-	-	-
KpS89	Tc	TEM-21	A/C	-	-	-
KpS68	Tc	TEM-129	A/C	-	-	-
KpS16	Tc	CTX-M-3	L/M	+L/M	-	-
KpS23	Tc	CTX-M-3	NT	-	-	-
KpS36	Tc	CTX-M-3, OXA-1	FII	+F	+	-
KpS43	Tc	CTX-M-3	N	-	-	-
KpS47	Tc	CTX-M-3	L/M	+L/M	-	-
KpS18	Tc	CTX-M-15, OXA-1	FII	+F	+	-
KpS19	Tc	CTX-M-15, OXA-1	N	+F	+	-
KpS45	Tc	CTX-M-15, OXA-1	L/M	-	-	-
KpS46	Tc	CTX-M-15	L/M	+L/M	-	-
KpS48	Ep	CTX-M-15	L/M	+L/M	-	-
KpS49	Tc	CTX-M-15	L/M	+L/M	-	-
KpS55	Tc	CTX-M-15, OXA-1	NT	-	-	-
KpS56	Tc	CTX-M-15, OXA-1	FIIk, R	+F	-	-
KpS57	Ep	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1	FII	+F	+	-
KpS61	Tc	CTX-M-15, OXA-1	FII	+F	+	-
KpS65	Tc	CTX-M-15	V	-	-	-
KpS75	Tc	CTX-M-15, OXA-1	FIIk	+F	-	-
KpS78	Tc	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1	FIIk	-	-	-
KpS79	Tc	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1	FIIk	+F	-	-
KpS80	Tc	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1	FIIk, R	-	-	-
KpS82	Tc	CTX-M-15, OXA-1	FII	+F	+	-
KpS87	Tc	CTX-M-15, OXA-1	FIIk	+F	+	-
KpS10	Tc	ACC-1	A/C	-	-	+
KpS25	Tc	ACC-1	FIIk, R	-	-	-

KpS3	Tc	FOX-3	A/C	-	-	-
KpS8	Tc	CMY-2	A/C	-	-	-
KpS11	Tc	CMY-4	A/C	-	-	+
KpS86	Tc	CMY-4	A/C	-	-	-
KpS1	Tc	CMY-4	A/C	-	-	-
KpS4	Tc	DHA-1	A/C	-	-	-
KpS5	Tc	DHA-1	L/M	-	-	-
KpS28	Tc	DHA-1	L/M	-	-	-
KpS30	Tc	DHA-1, OXA-1	R	-	-	+
KpS33	Ep	DHA-1	NT	-	-	+
KpS34	Tc	DHA-1	L/M	-	-	-
KpS12	Tc	SHV-2, DHA-1 CTX-M-15, OXA-1,	FIIk, R	-	-	-
KpS20	Tc	SHV-2a	FII	+F	-	-
KpS14	Tc	CMY-4, VIM-4	A/C	-	-	-
KpS90	Ep	SHV-12, KPC-2	X	-	-	-
KpS13	Ep	VIM-1	NT	-	-	-
KpS91	Tc	KPC-2	NT	-	-	-
KpS92	Tc	VIM-1	A/C	-	-	-
KpS93	Tc	OXA-48	NT	-	-	-
KpS94	Tc	OXA-48	NT	-	-	-

*pemKI according to specific of F or L/M replicons

Publication N°5

Complete nucleotide sequence of KPC-2 and SHV-12 encoding plasmid pKpS90 from *Klebsiella pneumoniae*

Najiby Kassis-Chikhani, Lionnel Frangeul, Christian Sengelin, Sylvain
Brisse, Guillaume Arlet, Dominique Decré

Manuscrit en preparation

Nous avons séquencé et analysé la séquence complète du plasmide portant le gène de la carbapénémase KPC-2 et le gène la BLSE SHV-12 issus d'une des souches de *K. pneumoniae* responsable de l'épidémie à l'Hôpital Paul Brousse en 2009.

Ce plasmide a 2 particularités:

- C'est le premier plasmide séquencé portant à la fois un gène *bla*_{KPC} et un gène *bla*_{SHV-12};
- C'est le premier plasmide du groupe d'incompatibilité IncX porteur de carbapénémase KPC.

Ce plasmide (pKpS90) de 53 Kb a un GC% de 49 ; il appartient au groupe d'incompatibilité X; le gène *repB* a en effet 85% de similarité avec celui d'un plasmide IncX décrit chez *Morganella morganii* (N° accès dans GenBank YP004869670). Le squelette de pKpS90 (d'environ 43 Kb) est très similaire au plasmide pInX-SHV récemment publié (103). Ce plasmide porte un gène de partition *parA* et une région d'environ 35 Kb comprenant les gènes nécessaires au transfert par conjugaison.

pInX-SHV et pKpS90 sont tous les 2 porteurs d'un gène *bla*_{SHV} avec une organisation identique (une seule copie de l'IS26) mais dans le cas de pInX-SHV il s'agit de SHV-11 alors que c'est SHV-12 pour pKpS90. Il est intéressant de noter que le plasmide pInX décrit très récemment par Carattoli *et al.* était présent chez une souche de *K. pneumoniae* ST258 possédant plusieurs plasmides dont un porteur du gène *bla*_{KPC-3} (103).

L'environnement du gène *bla*_{KPC-2} est similaire à ceux décrits sur d'autres plasmides producteurs de KPC-2; il s'agit du transposon Tn4401 dans sa forme délétée de 100 pb en amont du gène *bla*_{KPC-2} (isoform a) (52, 141, 142). Ce transposon, dérivé de Tn3 et à l'origine de la dissémination des enzymes KPC, est en effet très conservé (112, 133, 152, 177).

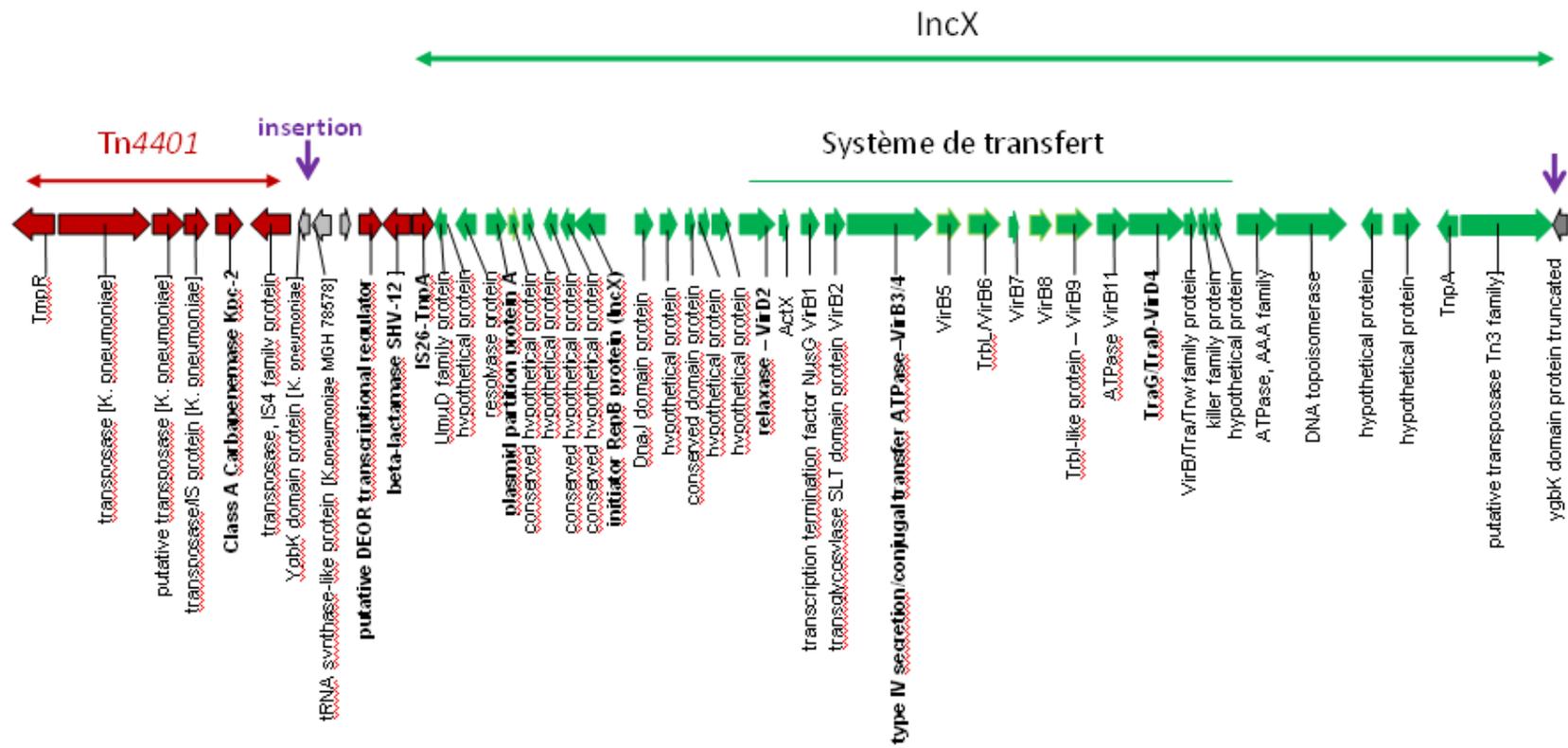
L'environnement du gène *bla*_{SHV-12} est similaires à ceux habituellement décrits pour les gènes codant les β-lactamases de type SHV. Il comprend

l'activateur transcriptionnel (DEOR), une partie d'un gène chromosomique de *K. pneumoniae* (ARNt synthétase) mais une seule copie de la séquence d'insertion IS26 qui est à l'origine de la mobilisation des gènes *bla_{SHV}* (101).

L'analyse des régions flanquantes de la partie codant les β -lactamases KPC-2 et SHV-12 suggère que le transposon Tn4401 s'est inséré dans un plasmide déjà porteur de *bla_{SHV-12}*. En effet, on retrouve de part et d'autre de l'insertion le domaine (YgbK) avec une duplication de 9 paires de bases. Le fait que notre plasmide ait un squelette identique au plasmide pIncX-SHV renforce cette hypothèse. Nous avons récemment entrepris l'étude d'une autre souche de *K. pneumoniae* uniquement productrice de SHV-12 mais isolée d'un des patients porteur d'une souche productrice de KPC-2. Les résultats préliminaires de la séquence de ce plasmide montrent qu'il appartient également au groupe d'incompatibilité IncX et qu'il est très proche, sinon identique, à pIncX-SHV à l'exception de la β -lactamase SHV, SHV-11 dans le cas de pIncX-SHV et SHV-12 dans le notre.

Ce travail décrit un nouveau plasmide codant les 2 β -lactamases KPC-2 et SHV-12. La nouveauté concerne 2 points : le groupe d'incompatibilité IncX et l'association des 2 β -lactamases. Si la structure du transposon Tn4401 est très conservée, les plasmides qui en sont porteurs sont différents par leur taille, par le site d'insertion et le groupe d'incompatibilité. Ce travail confirme que *bla_{KPC}* est capable de transposer sur différents réplicons, ce qui peut expliquer le succès de cette famille de carbapénémases.

Représentation schématique du plasmide pKpS90



Complete nucleotide sequence of KPC-2 and SHV-12 encoding plasmid pKpS90 from *Klebsiella pneumoniae*

Najiby Kassis-Chikhani¹, Lionnel Frangeul², Christian Sengelin¹, Sylvain Brisse³,
Guillaume Arlet⁴, Dominique Decré⁴

¹Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Paul Brousse, AP-HP, Villejuif 94804, France

²Génopole, Institut Pasteur, Paris, France

³Institut Pasteur, Genotypage des Pathogènes et Santé Publique, Paris, France

⁴Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine, Université Pierre et Marie Curie Paris 6

Abstract

We report the complete nucleotide sequence of the plasmids pKpS90 carrying the *bla*_{KPC-2} and *bla*_{SHV-12} from *Klebsiella pneumoniae* strain ST238 responsible for an outbreak in a French University hospital in 2009. pKpS90 is a 53.439-bp that belong to the incompatibility group IncX. It consists of the backbone of the IncX plasmid and carries a region encoding both KPC-2 and SHV-12. This region contains the transposon Tn4401 associated with a part encoding the *bla*_{SHV-12} similar to that of the pRMH712 from *K. pneumoniae*.

During the past decade, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae strains have emerged and spread worldwide. Resistance to carbapenem arises by the acquisition of various β -lactamases belonging to three Ambler classes A, B and D. Since the initial report of a KPC β -lactamase from a strain of *K. pneumoniae* in 1996, KPC producers have been reported from various geographical regions. Current reports indicate that KPC-producing isolates are widespread in China, Israel, Greece, South America and the USA (Nordmann *et al.* 2009; Nordmann *et al.* 2011).

Several KPC variants differing in one or two amino acids have been identified (KPC-1 to KPC-10) mainly in *K. pneumoniae* and to a lesser extent in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, KPC-2 and KPC-3 being predominant (Nordman *et al.* 2009 ; Cuzon *et al.* 2011; and <http://www.lahey.org/studies/>). Molecular analysis of the genetic environment of KPC genes showed that they are associated with transposons of the

same nature, *Tn3* type. Indeed, the *bla*_{KPC} genes are part of the *Tn4401* which has been detected among conjugative and non conjugative plasmids (Naas *et al.* 2008; Gootz *et al.* 2009). *Tn4401* is approximately 10Kb in size and is delimited by two 39-bp imperfect inverted repeat sequences and harbors insertion sequences named *ISKpn6* and *ISKpn7* in addition to transposase and resolvase genes. Three isoforms, a, b, and c of this transposon have been described, differing by a 100- to 200-bp sequence upstream of the β -lactamase gene KPC (Cuzon *et al.* 2010; Cuzon *et al.* 2011) and isoforms with deletions have been characterized recently (Kitchel *et al.* 2009 and 2010; Chen *et al.* 2011) but all reports and deposited sequences in *Tn4401* to GenBank to date have a largely conserved structure and sequence.

KPC-producing strains usually belong to sequence type (ST) 258 (Kitchel *et al.* 2009; Cuzon *et al.* 2010). *Tn4401* has been characterized on plasmids varying in size (12 to 80 kb), in insertion site and incompatibility group (Naas *et al.* 2008; Carattoli *et al.* 2009; Gootz *et al.* 2009; Andrade *et al.* 2011; Andrade *et al.* 2011).

Bacterial plasmids are extrachromosomal elements that play a crucial role in horizontal gene transfer. One of their great features is their ability to carry and transmit gene encoding resistance to antimicrobial compounds. Determination of the complete DNA sequences is the most accurate method to characterize plasmids and to provide valuable insights into their evolution and diversity.

Here we report the complete nucleotide sequence of plasmid pKpS90 which carries the KPC-2 gene from a *K. pneumoniae* ST258 responsible for an outbreak in a French University Hospital (Kassis-Chikhani *et al.* 2010). The strain was recovered in July 2009 at the Paul Brousse Hospital. The index case was a patient transferred from Athens. In addition to the *bla*_{KPC-2} gene, the isolate carried the ESBL gene *bla*_{SHV-12} and the narrow spectrum β -lactamases *bla*_{TEM-1} and *bla*_{OXA-9}. A plasmid of approximately 50 Kb positive for *bla*_{KPC} and *bla*_{SHV} genes transferred to *E. coli* was subjected to sequencing.

Plasmid pKpS90 was extracted from the *E. coli* electroporant DH10B using the Qiagen[®] Large construct kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Sequencing was performed using shotgun and 3 kb paired-end sequencing runs on a 454/Roche GS FLX analyzer (Roche, Basel, Switzerland). The resulting sequences were assembled to a unique scaffold and predicted gaps were closed by PCR followed by Sanger DNA sequencing using the Big Dye[®] Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Gene prediction and annotation were performed

with the CAAT-box tool developed by the Genopole of the Pasteur Institute of Paris (Frangeul *et al.* 2004).

The entire sequence of pKpS90 is composed of 53,439 bp forming a circular plasmid with a C+C% of 49% including 57 open reading frames (ORFs) and is related to the IncX plasmid family. The RepB protein showed 85% aminoacid identity within the IncX RepB from plasmid of *Morganella morganii* (GenBank accession number no. YP004869670). *In silico* analysis showed that pKpS90 possessed a high degree of sequence identity and gene synteny within its entire scaffold with the recent published plasmid pIncX-SHV (99% identity at the nucleotide level, accession number no. JN247852; Garcia-Fernandez *et al.* 2012) with the exception of a region of 12500 bp. The later carries the *bla*_{KPC-2} and the *bla*_{SHV-12} genes. *bla*_{KPC-2} from pKpS90 was part of a Tn4401 platform identical to the 10 kb element found (i) in plasmids carrying the *bla*_{KPC-2} such as plasmid S15 (GenBank accession number FJ223606) found in a *K. pneumoniae* strain isolated in New-York city, to p39SLMT and pNYC from *K. pneumoniae* strains (accessions no HQ589350 and EU176011) or (ii) in plasmid carrying the *bla*_{KPC-3} such as pKpQIL found in a *K. pneumoniae* strain recovered in Israel (accession no GU595196). This region carrying *bla*_{KPC-2} is surrounded by genes encoding full-length transposases and a recombinase as described previously (Naas *et al.* 2008 Gootz *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2010). It corresponds to the variant of Tn4401 designated as isoform a, which contains a 100 bp deletion between *bla*_{KPC} and *istB* genes.

The region surrounding the SHV-12 β -lactamase contains (i) the transcriptional activator DEOR which is usually associated with SHV-type ESBL, (ii) a part of tRNA synthetase-like protein previously found to be originating from the *K. pneumoniae* chromosome and (iii) only one copy of the IS26 insertion sequence know to be critical in the SHV mobilization (Ford & Avison 2004). This region is identical to the partial sequence of pRMH712 found in *K. pneumoniae* strain 4003 (GenBank accession no GU553923.1, position 1542 to 6376).

The analysis of the region flanking the β -lactamase genes suggested that the insertion of Tn4401 occurred on a plasmid already carrying the transposon encoding SHV-12. Indeed, insertion occurred in the YgbK domain protein with a 9 base pairs (CCTGCTCGG).

The remaining part of pKpS90 which showed high homology with pIncX-SHV (accession number no. JN247852), contained one *parA* gene (similar to partition gene from *Salmonella enterica* subsp. Heidelberg strain SL486, accession number no EDZ23062.1) and a full *tra* region involved in plasmid transfer via type IV secretion system (approximately 35 Kb).

In conclusion, pKpS90 is the first plasmid reported to encode both KPC-2 and SHV-12 β -lactamases genes. Moreover it is the first plasmid belonging to the IncX family that encodes *bla*_{KPC-2}. Indeed, plasmids carrying the KPC β -lactamase that were reported belonged to IncFII, IncN, IncL/M or were untypeable plasmids by using the PCR replicon typing method (Caratolli A. 2009; Leavitt *et al.* 2010; Andrade *et al.* 2011). It confirms that Tn4401 is able of transposition on various replicons and may explain the worldwide dissemination of KPC β -lactamase.

References

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3579-83. Epub 2011 May 16.

Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis*. 2010 Sep;16(9):1349-56.

Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Partial Excision of *bla*_{KPC} from Tn4401 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1635-8. Epub 2011 Dec 27.

Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):5350-3. Epub 2011 Aug 15.

Frangeul L, Glaser P, Rusniok C, Buschrieser C, Duchaud E, Dehoux P, Kunst F. CAAT-Box, Contigs-Assembly and Annotation Tool-Box for genome sequencing projects. *Bioinformatics*. 2004 Mar 22;20(5):790-7. Epub 2004 Jan 29.

Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*_{SHV} mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Jul;54(1):69-75. Epub 2004 May 26.

García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan 17. [Epub ahead of print]

Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 May;53(5):1998-2004. Epub 2009 Mar 2.

Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Sep;54(9):3967-9. Epub 2010 Jun 14.

Kassis-Chikhani N, Decré D, Ichai P, Sengelin C, Geneste D, Mihaila L, Dussaix E, Arlet G. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Jul;65(7):1539-40. Epub 2010 May 11. No abstract available.

Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct;54(10):4493-6. Epub 2010 Aug 9.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1257-63. Epub 2008 Jan 28.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009 Apr;9(4):228-36. Review.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1791-8.

DISCUSSION GENERALE PERSPECTIVES

A la suite des deux épidémies à *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases, nous avons défini une stratégie précise afin de limiter la diffusion de ces souches, en particulier dans des centres ou des unités recevant des patients fragiles et/ou immunodéprimés. Cette stratégie repose sur :

- Repérage des patients à risque : antécédents d'hospitalisation ou de résidence à l'étranger ;
- Mise en place et maintien des précautions contacts, isolement géographique, dépistage, organisation des soins avec application de la marche en avant (commencer les soins par les patients indemnes et non à risque et terminer par les patients à risque) ;
- En cas de dépistage positif, renforcement des mesures, surveillance accrue, formation du personnel et vérification quotidienne des mesures par l'EOH.
- En cas de cas secondaire, mise en place du cohorting et du personnel dédié.

Comme nous l'avons dit précédemment, ces mesures nous ont permis de maîtriser et de stopper la première épidémie et de très rapidement contrôler la seconde. Notre étude n'est pas une étude randomisée, permettant d'établir un lien fort entre intervention et résultat, due à la nécessité d'intervenir rapidement. D'autres paramètres pourraient expliquer ce succès (121), cependant il n'a jamais été décrit de résolution spontanée d'une épidémie en Grèce, en Israël ou à New-York où les IR-Kp sont endémiques (24, 260). Des mesures similaires ont été appliquées avec succès dans d'autres hôpitaux en France lors d'épidémies impliquant des souches productrices de carbapénémases (42) ou autres entérobactéries multirésistantes (188) mais également dans le contrôle de l'émergence des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) en France et en Hollande (164, 145). Ces mesures font parties des recommandations émises en 2009 par le CLIN central de l'AP-HP pour la prévention de la dissémination des entérobactéries productrices de carbapénémases (62)

et par le comité technique de lutte contre les infections nosocomiales et les infections liées aux soins pour la prévention de l'émergence des épidémies à ERG (75).

Le rapport 2010 de EARSS montre qu'en Europe la prévalence des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes passe de 8% en 2005 à 15 % en 2010 et dans certains pays comme la Grèce, elle atteint 49% (90). En France le nombre d'épisodes signalés à l'InVS est passé de 6 épisodes en 2009 à 62 pour le 9 premiers mois de 2011 (www.invs.sante.fr). En décembre 2010, les recommandations AP-HP et du CTINILS ont été complétées par la circulaire du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesures de contrôles des cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) visant à mettre en place des mesures d'hygiène préventives chez les patients ayant des facteurs de risques d'être porteurs de carbapénémases, en particulier les patients ayant un antécédent d'hospitalisation à l'étranger (61).

Les données de l'InVS montrent que depuis 2004 sur les 104 épisodes de signalés concernant les entérobactéries productrices de carbapénémases (i) 76 (73%) avaient un lien avec un séjour à l'étranger et 82 (79%) étaient des cas sporadiques (ii) que la mise en place des mesures de contrôle (le dépistage précoce des patients rapatriés, la mise en place des précautions « contact », la sectorisation, le suivi des patients « contacts ») a permis de maîtriser plus de 90% des épisodes signalés (www.invs.sante.fr).

En mars 2007, le ministère de la santé Israélienne a émis des recommandations visant à contrôler la dissémination des EPC similaires aux recommandations françaises. Ces mesures prévoient un cohorting des patients porteurs d'EPC, des dépistages systématiques des patients à l'admission, l'application stricte de précautions de type « contact », la formation du personnel aux bonnes pratiques en hygiène, la décontamination de l'environnement, du personnel paramédical dédié à

ce secteur, le dépistage des patients « contacts », une alerte informatique lors de réadmission des patients porteurs d'EPC ou des « contacts » afin qu'ils soient dépistés à l'admission et que les porteurs connus soient directement hospitalisés dans un secteur dédié. L'application de ces mesures est contrôlée par un groupe de travail dont le rôle est également de suivre l'évolution du nombre de cas. L'incidence mensuelle de patients porteurs d'EPC était, avant l'application de ces mesures et deux mois après leur mise en place, respectivement de 55,5 cas pour 100000 journées d'hospitalisation (JH) et 11,7 cas /100000 JH (237).

En 2009, le Center for Disease Control and Prevention (CDC) a également émis des recommandations pour la maîtrise de la dissémination des EPC (51), cependant moins drastiques que les recommandations françaises.

Ces mesures complètent les mesures préconisées en 2006 pour la maîtrise des bactéries multirésistantes (240) en insistant sur le dépistage actif des patients « contacts », la poursuite des dépistages hebdomadaires systématiques dans les services confrontés à une épidémie jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de nouveau cas et sur l'évaluation régulière de la prévalence de patients porteurs d'EPC par des dépistages dans les services confrontés de façon fréquente à ce type d'épidémies. Trois études récentes, montrent une diminution de l'incidence des cas de patients porteurs d'EPC après la mise en place de mesures d'hygiène drastiques (1, 60, 145).

On peut dire que maintenant cette stratégie est bien codifiée et validée.

Les autres facteurs qui participent au succès d'un clone comprennent son fond génétique et les facteurs de virulence ou de fitness c'est à dire, de capacité de survie de ce clone aussi bien chez l'homme que dans l'environnement. En effet, ces facteurs, dits « de virulence » doivent également permettre à la bactérie de survivre dans des conditions de stress environnementales. Dans les 5 dernières années, la littérature a

abondé en termes d'épidémies d'infections nosocomiales dues à des *K. pneumoniae* multirésistantes. Ces articles montrent bien qu'il existe un lien entre certains clones épidémiques producteurs des nouvelles β -lactamases et des fonds génétiques particuliers : c'est le cas de ST258 et de KPC-3, de ST11 ou ST15 ou ST47 et CTX-M-15, et enfin de ST101 ou ST395 et OXA-48. Il est donc fondamental de caractériser le fitness de ces clones épidémiques. C'est la raison pour laquelle, nous avons procédé à cette deuxième étude qui porte sur une collection de souches de *K. pneumoniae* multirésistantes. Ce travail est le premier à établir un lien entre résistance et virulence. Nous démontrons, en effet, une forte prévalence (42%) d'un îlot de pathogénicité et en particulier du sidérophore, la yersiniabactine, Ybts, qui joue essentiel dans l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia* sp. (43). Nous pouvons donc dire qu'il existe bien un lien entre résistance et virulence aussi bien dans les souches multirésistantes responsables d'infections isolées que d'épidémies.

D'autres facteurs, en particulier les supports génétiques, peuvent expliquer le succès de certains mécanismes de résistance comme les β -lactamases. Dans le troisième article, nous montrons que les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE de type CTX-M et tout particulièrement CTX-M-15, étaient associées à des plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité IncF, plasmides qui semblent être résidents chez *K. pneumoniae* et qui de plus portent un, voire deux systèmes de maintien ou systèmes d'addiction de type toxine-antitoxine. En revanche, les plasmides portant les gènes *bla*_{SHV} et ceux portant les carbapénémases, ont été moins bien caractérisés et sont souvent non typables par la méthode de PCR ; il nous a donc paru essentiel de les séquencer.

Nous avons procédé au premier séquençage d'un plasmide isolé d'une souche de *K. pneumoniae* portant à la fois KPC-2 et SHV-12 et responsable d'une épidémie dans notre hôpital. Cette analyse nous a

permis de mettre en évidence un nouveau groupe d'incompatibilité (IncX) impliqué pour la première fois dans la multirésistance chez *K. pneumoniae*. Nous avons pu également montrer l'insertion du transposon KPC au sein du transposon portant la BLSE de type SHV-12. Ce travail confirme donc les capacités importantes de transposition du transposon KPC.

Les perspectives de ce travail sont dans un premier temps :

- d'une part le séquençage de la région comprenant l'HPI et le système de sécrétion de type IV et la recherche d'un éventuel système de transfert et de mobilisation dans nos 30 souches multirésistantes possédant à la fois l'HPI et le gène *virB1*. Ceci nous permettrait d'émettre l'hypothèse que ces souches possèdent un ICE. Pour cela il nous faut démontrer l'existence d'une forme circulaire de cet ICE par PCR nichée et que cette structure est capable de transférer par conjugaison comme cela est décrit dans l'article (159). Au préalable, il faudrait intégrer une cassette de résistance particulière comme l'apramycine car nos souches sont multirésistantes.
- L'étude de la virulence de ces souches dans un modèle animal en créant un modèle d'infection avec des souches avec et sans yersiniabactine afin de préciser le rôle de la yersiniabactine dans l'infection à *K. pneumoniae*. Ceci pourrait être fait dans un modèle simple de septicémie chez la souris après injection intra-péritonéale.

A moyen terme, Il nous paraît indispensable de mieux caractériser les souches responsables d'épidémie, de déterminer leurs caractères de virulence, de séquencer les plasmides dont les groupes d'incompatibilité sont indéterminés afin de détecter rapidement les clones épidémiques.

Nous envisageons donc, dans le cadre d'un projet ANR, de séquencer près d'une cinquantaine de plasmides porteurs de multirésistance chez *K. pneumoniae*, afin de rechercher d'éventuels liens entre plasmides à

succès et gènes de résistance, entre systèmes d'addiction et plasmides à succès.

Enfin, grâce au développement des plates-formes de séquençage à haut débit, nous projetons dans le cadre d'une collaboration avec des microbiologistes de l'AP-HP et de l'Institut Pasteur de procéder au séquençage des génomes de plusieurs clones à succès comme le ST258, le ST15, ST11 et d'autres ST cités plus haut. Ce travail nous permettra entre autre de découvrir de nouveaux gènes de fitness. Il faudra évidemment, évaluer ces gènes candidats par des études *in vitro* et chez l'animal, ce qui nous invitera à développer encore d'autres collaborations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1.** Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Politi L, Koumaki V, Spanakis N, Giaquinta L, Valenti G, Romeo MA, Tsakris A. Containment of an outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *J Clin Microbiol*. 2011 Nov;49(11):3986-9.
- 2.** Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci*. 1999, 1; 4:D43-62. Review.
- 3.** Amako, K, Meno Y, and Takade A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol*. 1988; 170:4960–4962.
- 4.** Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289:321-31.
- 5.** Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2007;45:2723–5.
- 6.** Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA et al. *Bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2303–6.
- 7.** Arlet G, Rouvereau M, Casin I, Bouvet PJ, Lagrange PH, Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol*. 1994 Oct;32(10):2553-8.
- 8.** Arlet, G, and A. Philippon. Les nouvelles β-lactamases à l’aube du troisième millénaire. *Rev. Franç. Lab* 2003; 352:41-55.
- 9.** Athamna A, Ofek I, Keisari Y, Markowitz S and Sharon N. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun*. 1991;59:1673–1682.
- 10.** Bach S, de Almeida A, Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Feb 15;183(2):289-94.
- 11.** Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lépine F, Dozois CM, Weiser JN. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect Immun*. 2011 Aug;79(8):3309-16.

- 12.** Bagley ST, Seidler RJ, Talbot HWJ, and Morrow JE. Isolation of *Klebsiellae* from within living wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978;36:178-85.
- 13.** Baraniak A, Fielt J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:151-9.
- 14.** Bäumlér AJ, Tsolis RM, van der Velden AW, Stojiljkovic I, Anic S, Heffron F. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene.* 1996 Dec 12;183(1-2):207-13.
- 15.** Baumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voight W, Reissbrodt R, Rabsch W, Heffron F. Iron N, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 1998;180:1446-1453.
- 16.** Bearden SW, Fetherston JD and Perry RD. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1997;65:1659-1668.
- 17.** Bennet R, M. Eriksson, B. Melen, and R. Zetterström. Changes in the incidence and spectrum of neonatal septicemia during a fifteen-year period. *Acta Paediatr Scand.* 1985;74:687-90
- 18.** Bennett CJ, Young MN, Darrington H. Differences in urinary tract infection in male and female spinal cord injury patients on intermittent catheterization. *Paraplegia.* 1995;33:69-72.
- 19.** Benett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British J Pharmacol.* 2008;153: S347-S357.
- 20.** Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012 Jan 18.
- 21.** Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, Labia R, and Sirot J. A novel class A extended-spectrum-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44:3061-3068.
- 22.** Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases ; the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004. 48(1):1-14.
- 23.** Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.

- tel-00831671, version 1 - 7 Jun 2013
- 24.** Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med* 2005, 165 :1430–1435.
 - 25.** Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Guillans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New-York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49 : 3018–3020.
 - 26.** Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med*. 2005;165(12):1430–35.
 - 27.** Brandon K, Rasheed J.K, Patel J.B, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y .Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States: clonal expansion of MLST sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 3365–3370.
 - 28.** Brewer, R. J, Galland R. B, and Polk H. C. Amelioration by muramyl dipeptide of the effect of induced hyperferremia upon *Klebsiella* infection in mice. *Infect. Immun*. 1982; 38:175–178.
 - 29.** Brisse S, Issenhuth-Jeanjean S, Grimont PA. Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *J Clin Microbiol*. 2004 Aug;42(8):3388-98.
 - 30.** Brisse S, Fevre C, Passet V, Issennuth-Jeanjean S, Tounebize R, Diancourt L, Grimont P. Virulent clones of: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS ONE* 2009;4:4982.
 - 31.** Brown C, and RJ. Seidler. 1973. Potential pathogens in the environment: a taxonomic and ecological enigma. *Appl Microbiol*. 1973;25:900-4.
 - 32.** Burrus V, Pavlovic G, Decaris B and Guédon G. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular Microbiol*. 2002: 46 (3), 601-610.
 - 33.** Bush K, Jacoby G A, and Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
 - 34.** Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marscescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in

intensive care units from a chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemothe* 2008;52:2014–2018.

35. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466-75.

36. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:144-153.

37. Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1212–17.

38. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 2005; 63:219 –228.

39. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis.* 2006, 12:1145-8.

40. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53: 2227-38.

41. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Intern J Med Microbiol*, 2011, 301: 654-58.

42. Carbonne A, Thiolet JM, Fournier S, Fortineau N, Kassis-Chikhani N, Boytchev I, Aggoune M, Segulier JC, Senechal H, Tivolacci MP, Coignard B, Astagneau P, Jarlier V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill.* 2010 Dec 2;15(48).

43. Carniel E, Guilvout I, and Prentice M. Characterization of a large chromosomal 'high-pathogenicity island' in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 1996;178:6743–6751.

44. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int Microbiol.* 1999; 2(3):161-7.

45. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect.* 2001;3:561-569.

46. Carpenter JL. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis.* 1990; 12:672-82.

- 47.** Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8): 2950-4.
- 48.** Carrër A, Lassel L, Fortineau N, Mansouri M, Anguel N, Richard C, and Nordmann P. Outbreak of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* in the Intensive Care Unit of a French Hospital. *Microbial Drug Resistance* 2009;(15) 1 :47-54.
- 49.** Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:1369 –1373.
- 50.** Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Mar;53(3):1225-7.
- 51.** CDC 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009 Mar 20;58(10):256-60.
- 52.** Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Partial Excision of *bla*_{KPC} from Tn4401 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar;56(3):1635-8.
- 53.** Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene.* 2004 4;337:189-98.
- 54.** Chen YT, Shu HY, Li LH, Liao TL, Wu KM, Shiao YR, Yan JJ, Su IJ, Tsai SF, Lauderdale TL. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum-β-Lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50: 3861–3866.
- 55.** Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Arch Intern Med.* 1991 Aug;151(8):1557-9.

- 56.** Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect Immun*. 2004;72(7):3783-92.
- 57.** Christensen SC, and Korner B. An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. *Scand J Urol Nephrol*. 1972;6:232-8.
- 58.** Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:451-85. Review.
- 59.** Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis*. 2006 ;193(5):645-54.
- 60.** Ciobotaro P, Oved M, Nadir E, Bardenstein R, Zimhony O. An effective intervention to limit the spread of an epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an acute care setting: from theory to practice. *Am J Infect Control*. 2011;39(8):671-7.
- 61.** Circulaire N°DGS/RI/DGOS/PF/2010/413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesures de contrôles des cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC).
- 62.** CLIN AP-HP 2009. Recommandations du CLIN central de l'APHP du 6 février 2009. Prévention de l'émergence des entérobactéries résistantes à l'imipénème par carbapénémase.
- 63.** Coelho A, González-López JJ, Miró E, Alonso-Tarrés C, Mirelis B, Larrosa MN, Bartolomé RM, Andreu A, Navarro F, Johnson JR, Prats G. Characterization of the CTX-M-15 encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents* 2010 ;36: 73-78.
- 64.** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM). Recommandations 2010; page 4. (<http://www.sfm.asso.fr/>)
- 65.** Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008;14:195-200.
- 66.** Cooke EM, Pool R, Brayson JC, Edmondson AS, Munro ME, and Shinebaum R. 1979. Further studies on the source of *Klebsiella aerogenes* in hospital patients. *J Hyg Camb*. 83:391-5.

- 67.** Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* 1988;52:375-95. Review.
- 68.** Cryz SJ Jr, Fürer F, Germanier R. Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infect Immun.* 1984 Jan;43(1):440-1.
- 69.** Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52: 796–797.
- 70.** Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(9):3463-4.
- 71.** Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis.* 2010 Sep;16(9):1349-56.
- 72.** Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 betalactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(1):91-3.
- 73.** Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2420 –2423.
- 74.** CTIN 1999. Comité Technique national des Infections Nosocomiales (CTIN): Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Recommandations pour les établissements de santé. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, Secrétariat d'Etat à la Santé et à l'Action sociale. 1999.
- 75.** CTINILS Fiche technique opérationnelle. Décembre 2006. Prévention de l'émergence des épidémies d'entérocoques résistants à la vancomycine dans les établissements de santé.
- 76.** Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Mar;65(3):490-5.
- 77.** Damjanova I., Toth A., Paszti J., Hajbel-Vekony G., Jakab M., Berta J., Milch H. and Fuzi M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin resistant CTX-M-15-type β -lactamase-

producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new 'MRSA's'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 62, 978–985.

78. Davison, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 1999;42: 73–91.

79. Decré D, Gachot B, Lucet JC, Arlet G, Bergogne-Bérézin E, Rénier B. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 1998;27(4):834-44.

80. Decré D, Birgand G, Geneste D, Maury E, Petit JC, Barbut F, Arlet G. Possible importation and subsequent cross-transmission of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2010. *Euro Surveill.* 2010 Nov 18;15(46).

81. Decré D, Verdet C, Emirian A, Le Gourrierec T, Petit JC, Offenstadt G, Maury E, Brisse S, Arlet G. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):3012-4.

82. de la Cruz F, Davies J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* 2000;8:128–133.

83. de Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, Padoveze MC, Freire MP, Silveira FP, Paterson DL. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1790-3.

84. del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev,* 1998; 62:434-64.

85. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-82

86. Di Conza J, Ayala JA, Power P et al. Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2257–61.

87. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008;46:4083–6.

88. Domenico, P, Johanson W. G., and Straus D. C. Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1982;37:327–335.

89. Dortet L., Radu I, Gautier V, Blot F, Chachaty E, Arlet G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. J Antimicrob Chemother. 2008;6: 455–457.

90. EARSS Rapport 2010. European Antimicrobial Surveillance System. www.earss.rivm.nl/

91. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010. Report on the state of communicable diseases in the EU and EEA/EFTA countries 2010. (http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812_SUR_Annual_Epidemiological_Report_2010.pdf).

92. Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. J Antimicrob Chemother. 2006;57(1):14-23.

93. Edmondson AS, Cooke EM, Wilcock APD, and Shinebaum RA comparison of the properties of *Klebsiella* strains isolated from different sources. J. Med. Microbiol. 1980;13:541–550.

94. Ehrenwort L, and Baer H. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* for mice: the relationship to the quantity and rate of production of type-specific capsular polysaccharide. J. Bacteriol. 1956; 72:713–717.

95. Ensor VM, Shahid M, Evans JT, Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β -lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. J Antimicrob Chemother 2006;58:1260–3.

96. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel Virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary septic metastatic complications. J Exp Med. 2004;199(5):697-705.

97. Fetherston JD, Bertolino VJ, and Perry RD. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. Mol Microbiol. 1999;32:289–299.

98. Filutowicz M. Plasmids, Bacterial. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), 2009, pp. 644-665.

99. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, Raymond KN, Wanner BL, Strong RK, Walsh CT, Aderem A, Smith KD. The pathogen-

associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2c. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;31;103(44):16502-7.

100. Frazee BW, Hansen S, Lambert L. Invasive Infection With Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: Multiple Cases Presenting to a Single Emergency Department in the United States 2009. annals of emmergency medicine 53 :639-642.

101. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*_{SHV} mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. J Antimicrob Chemother. 2004;54(1):69-75.

102. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. J Antimicrob Chemother 2009; 632:274-81.

103. García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jan 17.

104. Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F. Identification of bacterial plasmid based on mobility and plasmid population biology. FEMS Microbiol Rev, 2011, 35: 936-56.

105. Gawron-Burke C, Clewell DB. A transposon in *Streptococcus faecalis* with fertility properties. Nature 1982;300:281-284.

106. Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother 2000;44 : 2247-53.

107. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, Papafraggas E, Malamou-Lada H, Tzouvelekis LS, Legakis NJ, Vatopoulos AC. VIM-1 metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol. 2003; 41(8): 3893-6.

108. Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos AC, Miriagou V, Zioga A, Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(9):4048-50.

109. Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. Clin Microbiol Infect 2008;14:11-32.

- 110.** Goldfarb D, Harvey SB, Jessamine K, Jessamine P, Toye B, Desjardins M. Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1920–1922.
- 111.** Gołębiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, Gniadkowski M, Bardowski J, Cegłowski P. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-3}. *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 3789–3795.
- 112.** Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 ;53(5):1998-2004.
- 113.** Gotoff S P. Sepsis in the newborn, p. 402-418. *In* S. Krugman, S. L. Katz, A. A. Gershon, and C. M. Wilfert (ed.), *Infectious diseases of children*, 9th ed. Mosby—Year Book, 1992, St. Louis, Mo.
- 114.** Groisman EA, and Ochman, H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 1996;87:791–794.
- 115.** Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*. 2010 Nov 18;15(46).
- 116.** Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, et Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48- like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(6):523-6.
- 117.** Haag H, Hantke K, Drechsel H, Stojiljkovic I, Jung G, Zähler H. Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol*. 1993;139(9):2159-65.
- 118.** Hacker J, Blum-Oehler G, Mühlendorfer I, and Tschäpe H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbio* 1997 23: 1089–109.
- 119.** Hacker, J., and Kaper, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54: 641–679.

- 120.** Harris RL and Silverman PM. Tra proteins characteristics of F-like type IV secretion systems constitute an interaction group by yeast two-hybrid analysis. *J Bacteriol.* 2004;186:5480-5.
- 121.** Harris AD, Bradham DD, Baumgarten M, Zuckerman IH, Fink JC and Perencevich EN. The use and interpretation of quasiexperimental studies in infectious diseases. *Clin Infect Dis.*2004;38(11):1586-91
- 122.** Hergenrother PJ. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* 2008; 12:389-99. Review.
- 123.** Haverkorn, ML, and Michel MF. Nosocomial *Klebsiellas* I. Colonization of hospitalized patients. *J. Hyg. Camb.* 1979;82:177-93.
- 124.** Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64 Suppl 1:i3-10.
- 125.** Hibbertrogers LCF, Heritage J, Gascoynebinzi DM, Hawkey PM, Todd N, Lewis IJ, and Bailey C. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995;36:65-8.
- 126.** Highsmith, AK, and Jarvis WR. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect. Control* 1985; 6:75-77.
- 127.** Ho PL, Lo WU, Yeung MK, Lin CH, Chow KH, Ang I, Tong AH, Bao JY, Lok S, Lo JY. Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One* 2011; 6:e17989.
- 128.** Hrabák J, Empel J, Bergerová T, Fajfrlík K, Urbásková P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M. International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital. *J Clin Microbiol.* 2009 Oct;47(10):3353-7.
- 129.** Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Labia R, Philippon A. B-lactamases of *Kluyvera ascorba*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother.*2002; 46: 3045.
- 130.** Iredell JR and Partridge SR. Understanding the shared gene pool in Gram-negative bacteria. *Infectious Disease Informatics* (Sintchenko V, ed), 2010: 245-261.
- 131.** JainR, Rivera MC, Moore JE, and Lake JA. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor Popul Biol* 2002; 61: 489-495.

132. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):867-78.

133. Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3967-9.

134. Jurado RL. Iron, Infections, and Anemia of Inflammation. *Clin Infect Dis* 1997;25:888–895.

135. Kabha, K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis LAS, Grue R. M., Schlepper-Shafer J, Ezekowitz ARB, Ohman D.E, and Ofek I. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1995;63:847–852.

136. Kabha K, Schmegner J, Keisari Y, Parolis H, Schlepper-Schaefer J, and Ofek I. SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1997;272: L344–L352.

137. Kado CI, Lui ST. A rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365–73.

138. Kanso A., Moubareck C., Chatel-Poujade J., Bisson A., Karam Sarkis D. Beta-lactamases of carbapenem resistant ggram-negative bacteria in Lebanon. 73/19o. RICAI 2011, Paris.

139. Kassis-Chikhani N, Decré D, Gautier V, Burghoffer B, Saliba F, Mathieu D, Samuel D, Castaing D, Petit J.C, Dussaix E, and Arlet G. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a french university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57: 142-5.

140. Kassis-Chikhani N, Decré D, Ichai P, Sengelin C, Geneste D, Mihaila L, Dussaix E, Arlet G. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2010 ;65(7):1539-40.

141. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3365-70.

142. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, Patel JB. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4201-7.

143. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983 ;11 :315-7.

144. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia:global differences in clinical patterns. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8:160-166.

145. Kochar S, Sheard T, Sharma R, Hui A, Tolentino E, Allen G et al. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol.*2009;30(5):447-52.

146. Koczura R, Kaznowski A.Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog.* 2003;35(5):197-202.

147. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9):597-602

148. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M. Quale J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn.N Y. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60 :78-82.

149. Lavigne JP, Botella E., O'Callaghan D. Les systèmes de sécrétions de type IV et leurs effecteurs. *Patho Biol* 2006 ; 54, 296-303.

150. Lawlor MS, O'connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect Immun.* 2007;75(3):1463-72.

151. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella*

pneumoniae strains in an Israeli hospital. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3026–3029.

152. Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. J Antimicrob Chemother. 2010;65(2):243-8.

153. Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(10):4493-6.

154. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(7):3002-6.

155. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH, et al. EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001;7:88–91.

156. Lee MY, Ko KS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. Int J Antimicrob Agents. 2011;38(2):160-3.

157. Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Drèze P, Van Melder L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. Nucleic Acids Res. 2011 3:5513-25.

158. Lin CJ, Siu LK, Ma L, Chang YT, Lu PL. Molecular Epidemiology of Ciprofloxacin-Resistant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Microb Drug Resist. 2011 Oct 24.

159. Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, Tsai SF, Wang JT. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. J Bacteriol. 2008;190(2):515-26.

160. Lin WH, Wang MC, Tseng CC, Ko WC, Wu AB, Zheng PX, Wu JJ. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing community-acquired urinary tract infections. Infection. 2010;38(6):459-64.

- 161.** Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:4793-9.
- 162.** Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis.* 2011;11(3):164.
- 163.** Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla_{VIM-1}*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(3):669-72
- 164.** Lucet JC, Armand-Lefevre L, Laurichesse JJ, Macrez A, Papy E, Ruimy R, Deblangy C, Lozach A, Lolom I, Jarlier V, Andreumont A, Leport C. Rapid control of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a French university hospital. *J Hosp Infect.* 2007;67(1):42-8.
- 165.** Lytsy B, Sandegren L, Tano E, Torell E, Andersson DI, Melhus A. The first majorextended-spectrum β -lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS* 2008;116:302-8.
- 166.** Ma L, Lin CJ, Chen JH, Fung CP, Chang FY, Lai YK, Lin JC, Siu LK; Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance Project. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):104-11
- 167.** Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J Infect Dis.* 2005;192(1):117-28.
- 168.** Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, Denamur E, Arlet G. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):67-71.
- 169.** Matar GM, Dandache I, Carrer A, Khairallah MT, Nordmann P, Sabra A, et al. Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum betalactamase. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010;104(3):271-4.
- 170.** Matsen, JM, Spindler JA, and Blosser RO. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl Microbiol.* 1974;28:672-678.

- 171.** Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, and Kato N. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsule (K) types. *Infect Immun.* 1983;40:56–61.
- 172.** Mnif B, Vimont S, Boyd A, Bourit E, Picard B, Branger C, Denamur E, Arlet G. Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1599-603.
- 173.** Mnif B., Ghribi I., Ktari S., Mahjoubi F., Hammami A. Bactériémies à *Klebsiella pneumoniae* producteurs de *bla*_{oxa-48} en Tunisie. 203/50o RICAI 2011, Paris.
- 174.** T. Naas, P. Nordmann, G. Vedel, C. Poyart. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4423–4424.
- 175.** Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(1):178-82.
- 176.** Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:42-52
- 177.** Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla* KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1257-63.
- 178.** Naas T, Cuzon G, Babics A, Fortineau N, Boytchev I, Gayral F, Nordmann P. Endoscopy-associated transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1305-6.
- 179.** Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, Inoue M. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48 : 1151-8.
- 180.** Nassif, X, and Sansonetti PJ. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun.* 1986;54:603–608.
- 181.** Nassif X, Honore N, Vasselon T, Cole ST, and Sansonetti PJ. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1989; 3:1349–1359.

- 182.** Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz MJ, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3098–3101.
- 183.** Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y. First report on hyper-epidemic clone of KPC-3 producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2009: 818–820.
- 184.** Nordmann P, Cuzon G, Naas T. *The real threat of Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(4):228-36.
- 185.** Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, and Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology* 2011 19(12): 588-595.
- 186.** Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment caused by Gram negative bacteria? *J. Antimicrob. Chemother* 2011;66, 689–692.
- 187.** Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev*, 1987; 51:381-95. Review.
- 188.** Ohana S, Denys P, Guillemot D, Lortat-Jacob S, Ronco E, Rottman M, Bussel B, Gaillard JL, Lawrence C. Control of an ACC-1-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a physical medicine and rehabilitation unit. *J Hosp Infect.* 2006;63(1):34-8.
- 189.** Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000;405: 299–304.
- 190.** Ofek I, Kabha K, Athamna A, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, and Ohman DE. Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infect Immun.* 1993; 61:4208–4216.
- 191.** Ogawa W, Li DW, Yu P, Begum A, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. *Biol Pharm Bull.* 2005 Aug;28(8):1505-8.
- 192.** Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR. Identification of a progenitor of the CTX-M-9

group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):2112-5.

193. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmidmediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34: 2200-9.

194. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccione D, Di Martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis 2008;14: 1178-1180

195. Paterson DL, and Bonomo R. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86.

196. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asendi MD. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother 2009;63: 265-268.

197. Peng, HL, Wang PY, Wu JL, Chiu CT, Chang HY. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. Chinese journal of microbiology and immunology 1991; 24: 264-271 in diabetic patients. Arch Intern Med. 1991;(151):1557-1559.

198. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol. 2007;7(5):459-69. Review.

199. Petermann SR, Sherwood JS, Logue CM. The *Yersinia* high pathogenicity island is present in *Salmonella enterica* Subspecies I isolated from turkeys. Microb Pathog. 2008;45(2):110-4.

200. Petersen J. Phylogeny and compatibility: plasmid classification in the genomics era. Arch Microbiol. 2011;193(5):313-21.

201. Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, Renard M, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (EBSBL) KPC-2 identified in two strains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3725-3736

202. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989;33 (Suppl. 5):1131-6.

203. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2002 ;46:1-11.

- 204.** Podschun R. Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. Zentbl. Hyg. Umweltmed.1990; 189: 527–535.
- 205.** Podschun R, Penner I, and Ullmann U. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. Microb. Pathog. 1992;13:371–379.
- 206.** Podschun R, and Ullmann U. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. J. Med Microbiol. 1992;36:250–254.
- 207.** Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603. Review.
- 208.** Poirel L, Kampfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46 :4038-40.
- 209.** Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:15–22.
- 210.** Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} beta-lactamase gene. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jan;49(1):447-50.
- 211.** Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol 2007;2:501-12.
- 212.** Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:75-81. Review.
- 213.** Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan;54(1):24-38.
- 214.** Poirel L, et al. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother.2011; 55:2546 –2551.
- 215.** Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. 2011 Antimicrob. Agents Chemother. 48:559-562.

216. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L 2011. Characterization of OXA-181, a carbapenemhydrolyzing classD-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother.2011; 55:4896–4899.

217. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2011. Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4405–4407.

218. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A Detection of the new metallo-beta-lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Chemother. 2010;65(8):1604-7.

219. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. J Antimicrob Chemother. 2009;64(2):348-52

220. Power P, Galleni M, Di Conza J et al. Description of *In116*, the first *bla*_{CTX-M-2} -containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 461–5.

221. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007;20:440-58.

222. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Couto E, Gutkind G; Microbiology Study Group. Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Sep;47(9):2864-7.

223. Randrianirina F, Vedy S, Rakotovao D, Ramarokoto CE, Ratsitohaina H, Carod JF,et al. Role of contaminated aspiration tubes in nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-2 and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases. J Hosp Infect 2009;72:23–9.

224. Regué M, Hita B, Piqué N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, Benedí VJ, Tomás JM. A gene *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2004;72(1):54-61.

225. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother. 2007;60(5):1018-29.

- 226.** Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: D269-70.
- 227.** Rodloff AC, Leclercq R, Debbia EA, Cantón R, Oppenheim BA, Dowzicky MJ. Comparative analysis of antimicrobial susceptibility among organisms from France, Germany, Italy, Spain and the UK as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(4):307-14.
- 228.** Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol.* 2004;27(1):27-35.
- 229.** Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):33-41.
- 230.** Ruppé E. Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi: l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques* 2010 (12)1 :3-16.
- 231.** Sabaté M, Navarro F, Miró E, Campoy S, Mirelis B, Barbé J, Prats G. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2656-61
- 232.** Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 209: 161-8.
- 233.** Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):654-8.
- 234.** Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):4626-33.
- 235.** Schubert S, Dufke S, Sorsa J & Heesemann J. A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol Microbiol* 2004; 51: 837-848.
- 236.** Schumacher MA. Structure and function of plasmid partition proteins. *Biochem J* 2008;412: 1-18

- 237.** Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B, Shalit I, Carmeli Y. Israel Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Working Group. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 2011;52(7):848-55.
- 238.** Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun.* 1998;66(6):2887-94.
- 239.** Sengupta M. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect Immun,* 2011; 79: 2502-09.
- 240.** Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control.* 2007;35(10 Suppl 2):S165-93.
- 241.** Simoons-Smit AM, Verwey-van Vught AM, Kanis IY, MacLaren DM. Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 1984; 17:67-77.
- 242.** Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AM, Kanis IY, MacLaren DM. Chemiluminescence of human leucocytes stimulated by clinical isolates of *Klebsiella*. *J. Med. Microbiol.* 1985;19:333-338.
- 243.** Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AM, MacLaren DM. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J. Med. Microbiol.* 1986; 21:133-137.
- 244.** Sirot D, Labia R., Morand A., Courvalin P., Darfeuille-Michaud A., Perroux R., and Cluzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987;20(3): 323-334.
- 245.** Sirot D. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 36:19-34.
- 246.** Smillie C *et al.* Mobility of plasmids. *Microbiol Molec Biol Rev.* 2010, 74: 434-52.
- 247.** Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J; European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill.* 2010 Nov 18;15(46).

- 248.** Struve C, Bojer M, Nielsen EM, Hansen DS, Krogfelt KA. Investigation of the putative virulence gene *magA* in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: *magA* is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. J Med Microbiol. 2005;54:1111-3.
- 249.** Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. Infect Immun. 2008;76(9):4055-65.
- 250.** Tegmark Wisell K., Haeggman S., Gazelius L., Thompson O., Gustafsson I., Ripa T. *et al.* Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. Euro Surveill, E071220.3. (2007), p. 12
- 251.** Thomas CM and Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol, 2005; 39:711-21. Review.
- 252.** Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. J Clin Microbiol. 2008;46:3080–3083.
- 253.** Torres AG, Redford P, Welch RA, Payne SM. TonB dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. Infect Immun.2001; 69:6179–6185.
- 254.** Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):329-32.
- 255.** Tumbarello, M., T. Spanu, M. Sanguinetti, R. Citton, E. Montuori, F. Leone, G. Fadda and R. Cauda. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. Antimicrobial. Agents Chemother. 2006;50:498-504.
- 256.** Turton JF, Englender H, Gabriel SN, Turton SE, Kaufmann ME, Pitt TL. Genetically similar isolates of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing liver abscesses in three continents. J Med Microbiol. 2007;56:593–597.
- 257.** Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp.

and comparison of isolates within these serotypes. FEMS Microbiol Lett. 2008;284(2):247-52.

258. Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum betalactamase- producing Enterobacteriaceae during non outbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004;42:4769–75.

259. Van Melder L. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? Curr Opin Microbiol, 2010; 6: 781-5. Review.

260. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece - a review of the current evidence. Euro Surveill. 2008;13(4).

261. Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM, Jarlier B, Coignard B. Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2004 to 2011. Euro Surveill. 2011;16(22).

262. Venegas, MF, Navas EL, Gaffney RA, Duncan JL, Anderson BE, and Schaeffer AJ. 1995. Binding of type 1-piliated *Escherichia coli* to vaginal mucus. Infect Immun. 63:416–422.

263. Verdet C, Benzerara Y, Gautier V, Adam O, Ould-Hocine Z, Arlet G. Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(2):607-17.

264. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991 Dec 25;19(24):6823-31.

265. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. J Antimicrob Chemother, 2010; 65:2518-29.

266. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob Agents Chemother 2006;50: 2880–2882

267. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1553–1555.

268. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2005 Nov;11 Suppl 6:2-9. Review.

269. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. Curr Opin Infect Dis 2008;21:367-71.

270. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect Dis. 2011;11(5):355-62.

271. Wang JH, Liu YC, Lee SS, et al. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clin Infect Dis. 1998;26:1434-1438.

272. Ward, R.E. Painter, D.F. Suber, D. Shungu, L.L. Silver, K. Inglima, J. Kornblum, and D.M. Livermore. 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. Antimicrob Agents Chemother. 48:4793-9

273. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2385-92

274. Williams P, Lambert A, Brown MRW and Jones RJ. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. J Gen Microbiol.1983;129:2181-2191.

275. Williams P, and Tomas JM. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. Rev Med Microbiol. 1990;1:196-204.

276. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vazquez GJ, Sante MI, Aquino E, Goering RV, Hanson ND. Surveillance of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Puerto Rico medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2009;53: 1660-1664.

277. Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(12):4793-9.

278. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM . Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom J Antimicrob Chemother 2008;62: 1261-1264

279. Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(8):552-63.

280. Wozniak RA, Fouts DE, Spagnoletti M, Colombo MM, Ceccarelli D, Garriss G, Déry C, Burrus V, Waldor MK. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 2009;5(12):e1000786.

281. Wu KM, Li LH, Yan JJ, Tsao N, Liao TL, Tsai HC, Fung CP, Chen HJ, Liu YM, Wang JT, Fang CT, Chang SC, Shu HY, Liu TT, Chen YT, Shiau YR, Lauderdale TL, Su IJ, Kirby R, Tsai SF. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol.* 2009;191(14):4492-501.

282. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenemhydrolyzing beta-lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151-61.

283. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strains of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 ;47 :3881–3889

284. Yokochi, T, Nakashima I, and Kato N. Effect of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* on the differentiation and functional capacity of macrophages cultured *in vitro*. *Microbiol Immunol.*1977;21:601–610.

285. Yokochi T, Nakashima I, and Kato N. Further studies on generation of macrophages in *in vitro* cultures of mouse spleen cells and its inhibition by the capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Immunol.*1979;23:487–499.

286. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-54

287. Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman P von Gottberg A, Goossens H, Wagener MM, Benedi VJ; International Klebsiella Study Group. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* 2007;13: 986-993.

288. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, Fung CP, Chuang YC. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clin Infect Dis. 2006 15;42(10):1351-8.

289. Zerouali K, Bouhali Zriouil S, Timinouni M, Laalej Z, Belabbes H, Elmdaghri N. Epidémie à *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase oxa-48 au CHU Ibn Rochd de Casablanca, Maroc.72/19o. RICAI 2011, Paris.

280. Zhang R, Zhou HW, Cai JC, Chen JX. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. J Antimicrob Chemother 2007;59:574–576

291. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. Future Microbiol. 2011;6(3):317-33.

ANNEXES