



**HAL**  
open science

# Les infections nosocomiales : l'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause : exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce

Thibault Monnet

## ► To cite this version:

Thibault Monnet. Les infections nosocomiales : l'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause : exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00656963

**HAL Id: dumas-00656963**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00656963v1>**

Submitted on 5 Jan 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

---

**LES INFECTIONS NOSOCOMIALES :**  
L'IMPORTANCE D'UN SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE  
ET DE L'IDENTIFICATION RAPIDE DES  
BACTERIES EN CAUSE.

**EXEMPLE DE QUELQUES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC  
PERMETTANT CETTE IDENTIFICATION PRECOCE.**

---

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

MONNET Thibault

Né le 27 Mars 1987 à Voiron

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE\*

Le 9 Décembre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Pr Michel SEVE, PharmD, PhD

Directeur de Thèse : Dr Javier YUGUEROS MARCOS, PhD

Membres :

Dr Jean BRETON, PharmD, PhD

Pr Max MAURIN, MD, PhD

*\* La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leur auteurs.*

---

**LES INFECTIONS NOSOCOMIALES :**  
L'IMPORTANCE D'UN SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE  
ET DE L'IDENTIFICATION RAPIDE DES  
BACTERIES EN CAUSE.

**EXEMPLE DE QUELQUES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC  
PERMETTANT CETTE IDENTIFICATION PRECOCE.**

---

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

MONNET Thibault

Né le 27 Mars 1987 à Voiron

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE\*

Le 9 Décembre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Pr Michel SEVE, PharmD, PhD

Directeur de Thèse : Dr Javier YUGUEROS MARCOS, PhD,

Membres :

Dr Jean BRETON, PharmD, PhD

Pr Max MAURIN, MD, PhD

*\* La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leur auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. Christophe REBUOT

Vice-doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2010-2011

MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)

|                    |            |  |
|--------------------|------------|--|
| ALDEBERT           | Delphine   | Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)                |
| ALLENET            | Benoît     | Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG /MCU-PH)    |
| BATANDIER          | Cécile     | Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)               |
| BRETON             | Jean       | Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN) |
| BRIANCON-MARJOLLET | Anne       | Physiologie Pharmacologie (HP2)                  |
| BUDAYOVA SPANO     | Monika     | Biophysique (I.B.S)                              |
| CAVAILLES          | Pierre     | Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)       |
| CHOISNARD          | Luc        | Pharmacotechnie (D.P.M)                          |
| DELETRAZ-DELFORTE  | Martine    | Droit Pharmaceutique                             |
| DEMEILLIERS        | Christine  | Biochimie (L.B.F.A)                              |
| DURMORT-MEUNIER    | Claire     | Biotechnologies (I.B.S)                          |
| GEZE               | Annabelle  | Pharmacotechnie (D.P.M)                          |
| GERMI              | Raphaëlle  | Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)               |
| GILLY              | Catherine  | Chimie Thérapeutique (D.P.M)                     |
| GROSSET            | Catherine  | Chimie Analytique (D.P.M)                        |
| GUIEU              | Valérie    | Chimie Analytique (D.P.M)                        |
| HININGER-FAVIER    | Isabelle   | Biochimie (L.B.F.A)                              |
| JOYEUX-FAURE       | Marie      | Physiologie - Pharmacologie (HP2)                |
| KHALEF             | Nawel      | Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)                  |
| KRIVOSOK           | Serge      | Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)         |
| MOUHAMADOU         | Bello      | Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)        |
| MORAND             | Jean-Marc  | Chimie Thérapeutique (D.P.M)                     |
| MELO DE LIMA       | Christella | Biostatistiques (L.E.C.A)                        |
| NICOLLE            | Edwige     | Chimie Thérapeutique (D.P.M)                     |
| PERES              | Basile     | Pharmacognosie (D.P.M)                           |
| PEUCHMAUR          | Marine     | Chimie Organique (D.P.M)                         |
| PINEL              | Claudine   | Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN /MCU-PH) |
| RACHIDI            | Walid      | Biochimie (L.C.I.B)                              |
| RAVEL              | Anne       | Chimie Analytique (D.P.M)                        |
| RAVELET            | Corinne    | Chimie Analytique (D.P.M)                        |
| SOUARD             | Florence   | Pharmacognosie (D.P.M)                           |
| TARBOURIECH        | Nicolas    | Biophysique (U.V.H.C.I.)                         |
| VANHAVERBEKE       | Cécile     | Chimie Organique (D.P.M)                         |
| VILLET             | Annick     | Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)  |

Doyen de la Faculté : M. Christophe KLSUOI

Vice-doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2010-2011

## PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

|              |            |  |
|--------------|------------|--|
| BAKRI        | Aziz       | Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG) |
| BOUMENDJEL   | Ahcène     | Chimie Organique (D.P.M.)  |
| BURMEISTER   | Wim        | Biophysique (U.V.H.C.I.)   |
| CALOP        | Jean       | Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)  |
| CORNET       | Murielle   | Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH) - <i>À partir du 1<sup>er</sup> mai</i> |
| DANEL        | Vincent    | Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)  |
| DECOUT       | Jean-Luc   | Chimie Inorganique (D.P.M.)  |
| DROUET       | Christian  | Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)   |
| DROUET       | Emmanuel   | Microbiologie (U.V.H.C.I.) -   |
| FAURE        | Patrice    | Biochimie (HP2/PU-PH)  |
| GODIN-RIEUOT | Diane      | Physiologie-Pharmacologie (HP2)  |
| GRILLOT      | René       | Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)   |
| LENORMAND    | Jean Luc   | Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)                                 |
| MOSSUZ       | Pascal     | Hématologie (PU-PH) - <i>À partir du 1<sup>er</sup> mai</i>                              |
| PEYRIN       | Eric       | Chimie Analytique (D.P.M.)   |
| SEVE         | Michel     | Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)  |
| RIBUOT       | Christophe | Physiologie – Pharmacologie (HP2)  |
| ROUSSEL      | Anne-Marie | Biochimie Nutrition (L.B.F.A)  |
| WOUESSIDJEWE | Denis      | Pharmacotechnie (D.P.M.)   |

## ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

|          |        |                                |
|----------|--------|--------------------------------|
| BUSSER   | Benoît | Biochimie (IAB, AHU-Biochimie) |
| MONNERET | Denis  | Biochimie (HP2, AHU-Biochimie) |

## ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

|         |                 |                      |
|---------|-----------------|----------------------|
| COLLE   | Pierre Emmanuel | Maître de conférence |
| FITE    | Andrée          | Professeur Certifié  |
| GOUBIER | Laurence        | professeur Certifié  |

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI; Bureau de la Scolarité Pharmacie

## ATER (n= 5)

|                   |        |   |
|-------------------|--------|---|
| DEFENDI Frédérica | ATER   | Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)           |
| GRATIA Séverine   | ½ ATER | Biochimie Biotechnologie (LBFA)             |
| REGENT Myriam     | ½ ATER | Biochimie Biotechnologie (IAB)              |
| ROSSI Caroline    | ATER   | Anglais Master ISM (JR)                     |
| RUFFIN Emilie     | ATER   | Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve) |
| SAPIN Emilie      | ATER   | Physiologie Pharmacologie (HP2)             |

## MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

|            |             |                            |                            |
|------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| BOUCHET    | Audrey      | (01-10-2009 au 30-09-2012) | Biotechnologie (GIN, ESRF) |
| DUCAROUGE  | Benjamin    | (01-10-2008 au 30-09-2011) | Laboratoire HP2 (JR)       |
| FAVIER     | Mathieu     | (01-10-2009 au 30-09-2012) | Laboratoire HP2 (JR)       |
| GRAS       | Emmanuelle  | (01-10-2010 au 30-09-2013) | Laboratoire HP2 (JR)       |
| HAUDECOEUR | Romain      | (01-10-2008 au 30-09-2011) | Chimie Thérapeutique (DPM) |
| LESART     | Anne-Cécile | (01-10-2009 au 30-09-2013) | Informatique C2i           |
| POULAIN    | Laureline   | (01-10-2009 au 30-09-2012) | Laboratoire HP2 (JR)       |

## PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

|           |          |  |
|-----------|----------|--|
| BELLET :  | Béatrice | Pharmacie Clinique                           |
| RIEU      | Isabelle | Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)       |
| TROUILLER | Patrice  | Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU) |

ATER : Attaches Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »  
IBS : Institut de Biologie Structurale  
JR : Jean Rogot  
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel  
PRAG : Professeur Agrégé  
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

## Remerciements

Je souhaite remercier avant tout ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de mes études.

Je tiens aussi à remercier sincèrement tous les membres de mon jury qui, en plus d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer ce travail, ont joué un rôle important au cours de ma formation. Merci à Michel Sève, pour la prise en charge de la présidence de ce jury mais également pour m'avoir suivi et encadré au cours de mon stage de Master 1 et de mon projet médicament. Merci à Max Maurin, pour m'avoir permis de découvrir mon intérêt à la fois pour la bactériologie et pour la biologie moléculaire. Merci à Jean Breton, pour son investissement dans ce Master 2 si intéressant, et sans qui cette formation n'aurait pas la même qualité. Merci à Javier Yugueros Marcos, pour m'avoir encadré et conseillé au cours de la rédaction de cette thèse. Merci également à lui, ainsi qu'à Virginie Moucadel et tous les membres du département Biomarker, pour tous ce que j'ai appris sur les plans professionnel et humain au cours de mon stage de Master 2 au sein de bioMérieux.

## Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Remerciements .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Liste des figures.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Liste des tableaux.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>Abréviations .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>Introduction.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>Objectifs.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>1. Epidémiologie.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.1. Critères épidémiologiques.....</b>                                       | <b>15</b> |
| <b>1.2. Prévalences et incidences .....</b>                                      | <b>15</b> |
| 1.2.1. Ensemble des infections nosocomiales .....                                | 15        |
| 1.2.2. Infections nosocomiales au sein des unités de soins intensifs .....       | 16        |
| 1.2.3. Types d'infections nosocomiales.....                                      | 18        |
| <b>1.3. Les pathogènes impliqués dans les infections nosocomiales ..</b>         | <b>21</b> |
| 1.3.1. Ensemble des infections nosocomiales .....                                | 21        |
| 1.3.2. Les infections nosocomiales au sein des USI .....                         | 24        |
| 1.3.3. Les pathogènes causant les différents types d'infections nosocomiales.... | 25        |
| <b>1.4. Les résistances aux antibiotiques .....</b>                              | <b>30</b> |
| 1.4.1. Réseaux de surveillance des résistances aux antibiotiques.....            | 32        |
| 1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 33        |



|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 1.4.3.      | <i>Enterococcus</i> spp .....                                    | 33        |
| 1.4.4.      | <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....                            | 34        |
| 1.4.5.      | <i>Clostridium difficile</i> .....                               | 34        |
| 1.4.6.      | <i>Escherichia coli</i> .....                                    | 35        |
| 1.4.7.      | <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                               | 36        |
| 1.4.8.      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                              | 37        |
| 1.4.9.      | <i>Acinetobacter baumannii</i> .....                             | 38        |
| <b>1.5.</b> | <b>Impact humain et économique des infections nosocomiales..</b> | <b>39</b> |
| <b>2.</b>   | <b>Diagnostic du laboratoire de microbiologie clinique .....</b> | <b>41</b> |
| <b>2.1.</b> | <b>Intérêts d'un diagnostic rapide.....</b>                      | <b>41</b> |
| <b>2.2.</b> | <b>Techniques de diagnostic bactériologique rapides .....</b>    | <b>42</b> |
| 2.2.1.      | La PCR en temps réel .....                                       | 46        |
| 2.2.2.      | Tests basés sur la technique de FISH.....                        | 53        |
| 2.2.3.      | Spectrométrie de masse MALDI-TOF .....                           | 60        |
| 2.2.4.      | PCR – ESI.....   | 65        |
| <b>3.</b>   | <b>Discussion .....</b>  | <b>70</b> |
|             | <b>Conclusion .....</b>  | <b>81</b> |
|             | <b>Bibliographie .....</b>                                       | <b>83</b> |
|             | <b>Serment de Galien.....</b>                                    | <b>90</b> |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Fréquences des différents types d'infections nosocomiales.....   | 18 |
| Figure 2 : Origine des septicémies survenant au sein des USI .....  | 19 |
| Figure 3 : Densité de l'incidence des infections DM-associées au sein des USI.....  | 20 |
| Figure 4 : Prévalence des pathogènes responsables d'infections nosocomiales.....  | 23 |
| Figure 5 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections nosocomiales au sein des USI.....   | 24 |
| Figure 6 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections urinaires nosocomiales.....   | 26 |
| Figure 7 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections du site opératoire..  | 27 |
| Figure 8 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections pulmonaires nosocomiales.....   | 28 |
| Figure 9 : Prévalences des pathogènes responsables de septicémies nosocomiales .....  | 30 |
| Figure 10 : Traitement des prélèvements au laboratoire de microbiologie clinique : techniques diagnostiques et délais avant résultats ..... | 43 |
| Figure 11 : Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®).....  | 50 |
| Figure 12 : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.....  | 62 |
| Figure 13 : Principe de la technique de PCR-ESI .....   | 66 |

## Liste des tableaux

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tableau I : Fréquence d'utilisation des dispositifs médicaux au sein des USI .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Tableau II : Episodes épidémiques d'infections nosocomiales.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>Tableau III : Résumé des pathogènes les plus fréquemment isolés dans les infections nosocomiales, selon le type d'infection et la région .....</b> | <b>31</b> |
| <b>Tableau IV : Comparaison des techniques de diagnostic rapide évoquées.....</b>   | <b>73</b> |

## Abréviations

ADN : acides désoxyribonucléiques

ARN : acides ribonucléiques

BLSE : béta-lactamases à spectre étendu

C3G : céphalosporines de troisième génération

CDC : Center for Disease Control and Prevention

DM : dispositif médical

EARS-NET : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

EARSS : European Antimicrobial Resistance Surveillance System

ECDC : European Center for Disease Prevention and Control

ERV : entérocoques résistants à la vancomycine

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence (fluorescent *in situ* hybridization, en anglais)

IN : infection nosocomiale

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LCR : liquide céphalo-rachidien

MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionization – time of flight

MLS : marcolides, lincosanides, streptogramines

NHSN : National Healthcare Safety Network

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAVM : pneumopathies acquises sous ventilation mécanique

PCR : réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction, en anglais)

PCR-ESI : PCR couplée à la spectrométrie de masse electro-spray ionization

PED : pays en voie de développement

PID : pays industrialisés et développés

PNA : acide nucléiques peptidiques (peptid nucleic acids, en anglais)

SARM : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline

SCN : Staphylococci coagulase négatifs

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

Sphère ORL. : sphère oto-rhino-laryngée

SPNM : *Streptococcus pneumoniae* non-sensibles aux macrolides

SPNP : *Streptococcus pneumoniae* non-sensibles à la pénicilline

TIDR : tests d'immuno-diagnostic rapides

USA : Etats Unis d'Amérique (United States of America, en anglais)

USI : unité de soins intensifs

UV : ultra violet

### **Unités**

Da : dalton

m : masse

mL : millilitre

% : pour cent

‰ : pour mille

UFC : unité formant une colonie

z : charge électrique

# Introduction

## Définition

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les **infections nosocomiales** (IN) peuvent être décrites comme « des infections survenant chez un patient **au sein d'un hôpital ou d'un autre établissement de santé** et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission. Cette définition inclut les infections contractées à l'hôpital mais qui se déclarent après la sortie, et également les infections professionnelles parmi le personnel de l'établissement (66) ».

Les agents pathogènes responsables d'IN peuvent avoir deux origines (33):

- Une **origine endogène**, c'est-à-dire qu'ils font partie de la flore commensale du patient. Les pathogènes sont présents chez le patient avant l'hospitalisation, par exemple au niveau des voies respiratoires, de la peau, de la sphère gastro-intestinale ou génitale.
- Une **origine exogène**, c'est-à-dire que le patient a été en contact avec ces organismes au cours de l'hospitalisation. Ces pathogènes peuvent provenir de la flore transitoire ou résidente du personnel soignant ou de visiteurs, de dispositifs médicaux (DM) et même de l'environnement et des locaux hospitaliers.

Ne sont pas considérées comme nosocomiales (33) les réactivations d'une infection latente (comme la réactivation du virus de l'herpès ou du zona), les infections trans-placentaires chez le nouveau-né qui se déclarent moins de 48 heures après la naissance (comme une infection par le cytomégalovirus) ou encore l'aggravation d'une infection déjà existante à l'admission du patient, à moins qu'elle ne soit due à un nouveau pathogène ou bien qu'une nouvelle porte d'entrée de l'infection soit identifiée.

### *Les différentes infections nosocomiales*

La fréquence et l'étiologie des IN est très variable, selon la région étudiée aussi bien que selon le type de service hospitalier et de patients concernés. Quelques catégories d'infections se distinguent néanmoins des autres (66) :

- **Les infections urinaires** : celles contractées lors d'un sondage urinaire à demeure sont les plus fréquentes.
- **Les infections du site opératoire** : on distingue pour cette catégorie les infections de la plaie opératoire (plutôt superficielle à l'origine) et les infections profondes touchant les organes. Les chirurgies visant à la mise en place d'une prothèse ou bien pour une transplantation peuvent causer des IN d'apparitions très tardives, jusqu'à un an après l'opération.
- **Les pneumopathies** : celles-ci sont en majorité associées à la mise en place d'une ventilation mécanique, ce qui constitue un réel fléau au sein des unités de soins intensifs (USI).
- **Les septicémies** : ici encore, l'utilisation de DM est associée à la plupart des cas de septicémies nosocomiales, que ce soient les dispositifs intra-vasculaires (comme les chambres de perfusion veineuse) ou les cathéters centraux ou périphériques.

Parmi les autres IN moins fréquentes et/ou de moindre gravité, on retrouve les infections de la peau et des tissus mous, les gastro-entérites (qui touchent surtout les enfants), les infections de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL) comme les sinusites ou les conjonctivites, ou encore les infections post-partum de la sphère génitale (66).

## *Diagnostic des infections nosocomiales*

Le diagnostic des infections nosocomiales repose sur des **critères cliniques, radiologiques, biologiques et microbiologiques**. Les trois premiers critères manquent bien souvent de spécificité et/ou de sensibilité. L'examen microbiologique permet **d'identifier les pathogènes** responsables des infections, et de déterminer leur sensibilité **aux antibiotiques**. Cela permet de choisir le traitement adapté à chaque patient. Avec l'apparition de plus en plus de souches multi-résistantes, la **surveillance** et le **diagnostic rapide** de ces pathogènes sont des éléments primordiaux.

## **Objectifs**

Le premier objectif de cette thèse était de faire un point sur l'**épidémiologie des infections nosocomiales**. Pour cela, une étude de la prévalence des infections nosocomiales et des variations de celle-ci à travers le monde a été réalisée. L'identification des principaux pathogènes et la fréquence de résistances aux antibiotiques ont ensuite été recensés. Finalement, les conséquences cliniques et économiques des infections nosocomiales ont été rapportées.

La deuxième partie de la thèse est dédiée au **diagnostic au sein du laboratoire de microbiologie clinique**. Des techniques permettant une identification rapide des pathogènes et de leurs marqueurs de résistances aux antibiotiques sont ensuite décrites. Pour chacune de ces techniques, les facteurs favorisant ou limitant leur utilisation en routine sont exposés.



# 1. Epidémiologie

## 1.1. Critères épidémiologiques

**La prévalence** : c'est le nombre de patients infectés, ou d'épisodes infectieux, pour 100 patients présents dans un établissement ou une unité de soins, à un instant donné (1, 67).

**L'incidence cumulative** : c'est le nombre de nouveaux patients infectés, ou de nouveaux cas d'épisodes infectieux, pour 100 patients suivis sur une période définie. Cette période varie selon la population de patients concernés : elle est de 30 jours en général pour les infections du site opératoire, alors que pour les autres types d'IN elle réfère à la durée d'hospitalisation (1, 67).

**La densité de l'incidence** : c'est le nombre d'épisodes infectieux pour 1 000 patients-jours ou dispositifs médicaux-jours (DM-jours). La différence avec l'incidence cumulative est que les variations de la durée de prise en charge des patients est prise en compte ici. Par exemple, un patient hospitalisé ou portant une sonde urinaire pendant un mois aura plus d'impact dans le calcul de cette incidence qu'un patient recevant ces mêmes soins sur une durée plus courte (1, 67).

## 1.2. Prévalences et incidences

### 1.2.1. Ensemble des infections nosocomiales

Selon un rapport de l'OMS datant de 2011 (67), 4,5% des patients nouvellement admis dans un hôpital, dans les pays industrialisés (PID), seront touchés par une IN (incidence cumulative). C'est en tout **7,1% des patients hospitalisés** qui souffrent d'au moins une IN, avec une prévalence de 7,6 épisodes infectieux pour 100 patients. L'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) estime ainsi que 4 131 000 patients en Europe ont développé une IN en 2008, pour un total de 4 544 100 épisodes infectieux (63). Aux

Etats Unis d'Amérique (USA), c'était 1,7 million de patients touchés en 2002 (38). Dans les pays en voie de développement (PED), la prévalence des IN est plus élevée, puisque c'est **10 à 15% des patients hospitalisés** qui sont concernés (67).

Les patients ayant le plus de risque de contracter une IN sont ceux qui séjournent en **USI**, les **patients brûlés** ou encore les patients ayant subi une **transplantation** (1). On peut également considérer dans cette catégorie tous les patients sensibles aux infections opportunistes en général : les patients âgés ou les nouveau-nés, ceux atteints de maladies chroniques comme le diabète ou l'insuffisance rénale et bien sûr les patients souffrant du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (66).

### 1.2.2. Infections nosocomiales au sein des unités de soins intensifs

**Les USI sont les services les plus touchés par les IN.** La prévalence y est d'environ 30% de patients infectés, dans les PID (67). Au niveau des PED, l'estimation est moins précise, à cause du manque de surveillance régulière au niveau national, et des grandes différences observées entre les études. L'incidence moyenne y serait de 35,2% des patients, mais elle varie entre 4,4% et 88,9%.

La densité d'incidence est de 17,0‰ patients-jour (13,0‰ à 20,3‰) pour les PID, et 42,7‰ patients-jour (4,1‰ à 91,7‰) pour les PED. Cela signifie que chaque jour, sur 1 000 patients hospitalisés en USI et qui ne souffrent pas d'IN, 17 patients en moyenne en contracteront une dans les PID, contre presque 43 patients en moyenne dans les PED, soit environ **2,5 fois plus**.

Quelques éléments peuvent expliquer cette prolifération des IN dans les USI. Tout d'abord, la **population de patients** qui y est hospitalisée est souvent poly-traumatique et les pathologies y sont sévères. Cela participe à rendre le système immunitaire de ces patients moins efficace, et donc plus vulnérables face aux infections. Il y a alors une **concentration**

**des pathogènes plus forte au sein des USI**, ce qui met en danger les patients en meilleure condition générale, qui seraient plus aptes à se défendre contre les infections s'il n'y avait pas cette proximité.

Un autre facteur important dans le développement des IN dans les USI est le **taux d'utilisation des DM**, qui est bien plus élevé que dans les autres services. Ainsi, il a été recensé aux USA en 2009 (16) un taux d'utilisation de cathéter central (veineux et artériels) s'élevant à 50% dans les USI contre 14,9% dans les autres services (rapport Nombre de cathéters centraux-jour / Nombre de patients-jour). On retrouve une différence similaire avec l'utilisation de cathéters urinaires (67,1% dans les USI contre 19,5%) et de ventilateurs mécaniques (36,3% dans les USI contre 16,8%) (tableau I). Ces DM, nécessaires pour les soins des patients, constituent également la **porte d'entrée principale des IN** au sein des USI. Aux USA, il est estimé que 97% des infections nosocomiales urinaires au sein des USI ont une origine associée au port de cathéter urinaire, que 87% des septicémies primaires sont associées à l'utilisation de cathéters centraux et que 83% des pneumopathies nosocomiales sont des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) (67). Ces trois types d'infections DM-associées constituent **72% des IN dans les USI des pays industrialisés** (figure 1) (67).

**Tableau I : Fréquence d'utilisation des dispositifs médicaux au sein des USI**

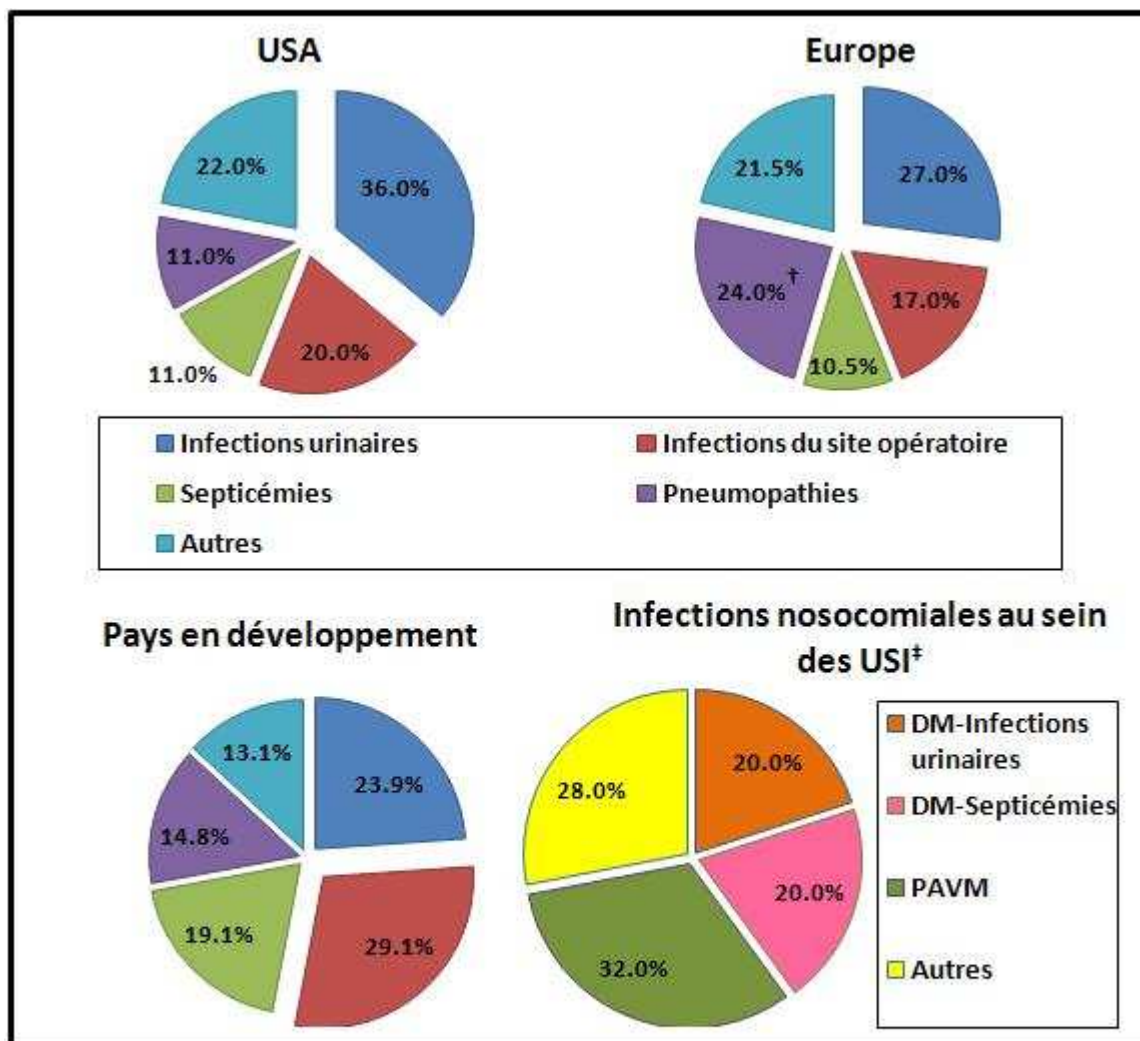
|  |                           | DM-jours  | Patients-jours | Fréquence d'utilisation des DM |
|--|---------------------------|-----------|----------------|--------------------------------|
| <b>Cathéters intravasculaires centraux</b> | Unités de soins intensifs | 4 589 378 | 9 186 473      | <b>50.0%</b>                   |
|  | Autres services           | 1 599 715 | 10 718 359     | <b>14.9%</b>                   |
| <b>Cathéters urinaires</b>                 | Unités de soins intensifs | 2 268 219 | 3 379 512      | <b>67.1%</b>                   |
|  | Autres services           | 1 850 086 | 9 504 265      | <b>19.5%</b>                   |
| <b>Ventilateurs mécaniques</b>             | Unités de soins intensifs | 1 662 732 | 4 578 117      | <b>36.3%</b>                   |
|  | Autres services           | 107 247   | 637 190        | <b>16.8%</b>                   |

D'après un rapport du National Healthcare Safety Network. Données de 2009, pour les USA (16).  
Fréquence d'utilisation des DM : nombre de DM-jours par rapport au nombre de patients-jours.

### 1.2.3. Types d'infections nosocomiales

Les quatre IN les plus fréquentes sont les **infections urinaires**, les **septicémies**, les **pneumopathies** et les **infections du site opératoire**. En Europe et aux USA, elles représentent environ 78% des IN totales, 86,9% dans les PED (figure 1) (67). Parmi les IN moins fréquentes, il y a les infections de la sphère ORL, de la sphère gastro-intestinale, de la sphère génitale ou encore de la peau et des tissus mous.

**Figure 1 : Fréquences des différents types d'infections nosocomiales**



† Comprend toutes les infections des voies respiratoires inférieures.

‡ Données pour les unités de soins intensifs dans les pays industrialisés.

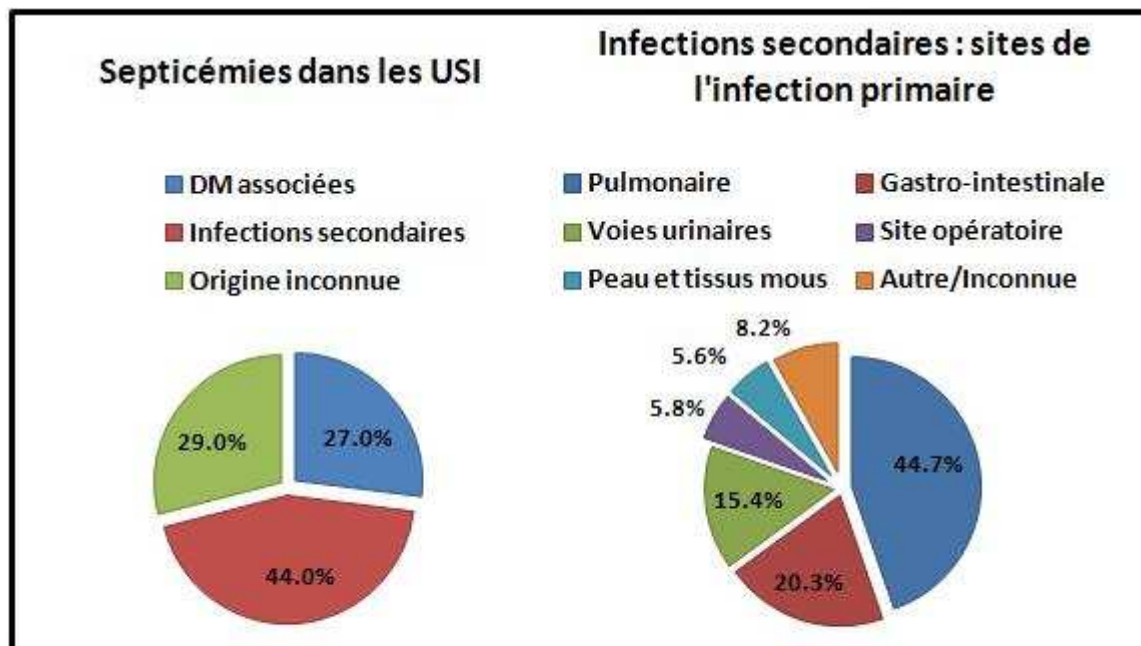
D'après un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, datant de 2011 (67).

Proportion des IN les plus fréquentes par rapport au nombre total d'IN, selon la région ou le service de soins.

**Aux USA, les IN les plus fréquentes sont les infections urinaires**, et largement, puisqu'elles représentent plus d'une IN sur trois (36% des IN). On trouve ensuite les infections du site opératoire (20% des IN), puis finalement les pneumopathies et les septicémies (chacune 11% des IN). **En Europe, les IN les plus fréquentes, les infections urinaires et les infections des voies respiratoires basses**, constituent chacune environ une IN sur quatre (respectivement 27% et 24% des IN). Les infections du site opératoire (17% des IN) et les septicémies (10,5%) sont légèrement moins fréquentes (figure 1).

**Dans les PED, l'infection la plus fréquente est l'infection du site opératoire**, avec 29,1% des IN totales. C'est un problème majeur dans ces pays, où elle est **deux à huit fois plus fréquente que dans les PID** : 11,8% des patients opérés contractent ce type d'infection (incidence cumulative moyenne), contre 1,5 à 5,2% dans les PID (figure 1).

**Figure 2 : Origine des septicémies survenant au sein des USI**



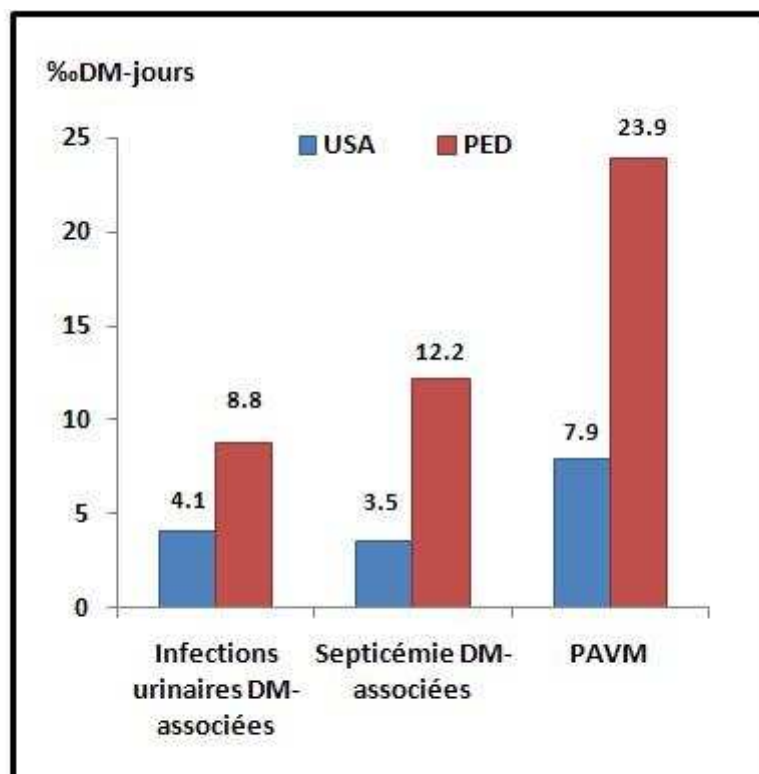
D'après un rapport du National Healthcare Safety Network. Données de 2009, pour les USA (16). Fréquences des septicémies primaires DM-associées et des septicémies secondaires, avec les pourcentages des différents sites primaires de l'infection causant ces dernières.

Comme vu précédemment, les IN au sein des **USI** sont majoritairement des infections DM-associées (~72% des IN), dans les PID. **Les PAVM à elles seules y représentent 32% des**

**IN totales**, suivies par les infections urinaires DM-associées et les septicémies primaires DM-associées, avec 20% des IN chacune (figure 1). Pour les septicémies contractées dans les USI, l'association à un DM est retrouvée dans 27% des cas. En revanche, les septicémies étant secondaires à une autre infection dans 44% des cas, infection dont l'origine est pulmonaire ou urinaire principalement (60,1% des septicémies secondaires), l'origine DM-associée des septicémies, tout DM compris (PAVM ou infection urinaire-DM associée), est plus fréquente (figure 2).

Les différences entre les PED et les PID, vis-à-vis du nombre d'IN contractées, sont également retrouvées au niveau des USI. **Les infections DM-associées y sont deux à trois fois plus fréquentes dans les PED (67)**, avec notamment une incidence de PAVM atteignant 23,9‰ DM-jours dans les PED, contre 7,9‰ DM-jours aux USA (figure 3).

**Figure 3 : Densité de l'incidence des infections DM-associées au sein des USI**



D'après un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé datant de 2011 (67). Différences de la fréquence des infections nosocomiales DM-associées entre les PED et les PID (USA), au sein des unités de soins intensifs.

## 1.3. Les pathogènes impliqués dans les infections nosocomiales

Pour les données concernant les PED, peu d'études multicentriques ou à l'échelle nationale existent. Les rapports utilisés ici, regroupant les résultats des études les plus complètes et les plus fiables, ne sont basés que sur un faible nombre d'isolats cliniques à chaque fois pour établir les prévalences des différents pathogènes selon les types d'IN. Ces résultats doivent donc être considérés avec prudence, puisqu'ils ne dégagent tout au plus qu'une tendance de ce qu'est la flore microbienne causant ces infections. Ils permettent toutefois d'estimer les différences qu'il peut y avoir entre les PID et les PED. Les données en provenance des PID sont plus complètes.

Un tableau récapitulatif des pathogènes le plus fréquemment isolés selon le type d'IN figure à la fin de cette partie (tableau III).

### 1.3.1. Ensemble des infections nosocomiales

Les bactéries représentent la majorité des pathogènes responsables d'IN (1,31,67). Parmi les bactéries à Gram négatif, la famille des *Enterobacteriaceae* est la plus représentée, et les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ont également un impact conséquent. Pour les bactéries à Gram positif, la "palme" revient aux genres *Staphylococcus* et *Enterococcus*, ce dernier étant tout de même moins fréquent que le premier. Des pathogènes fongiques sont également retrouvés, appartenant majoritairement au genre *Candida*. En situation endémique, il y a peu d'IN causées par des parasites ou des virus, bien que l'agent principal des gastro-entérites infantiles soit un rotavirus (66). En revanche, les épisodes épidémiques d'IN (environ 10% des IN) (63) sont causés par des virus dans 17% des cas, les virus des hépatites causant 10% des cas à eux seuls (tableau II). Seules les IN endémiques seront étudiées dans cette thèse.

L'étiologie des IN est variable : si les mêmes pathogènes sont retrouvés généralement, leur **prévalence est dépendante de la région ou des patients étudiés**, et peut même être très différente entre deux USI d'un même hôpital.

**Tableau II : Episodes épidémiques d'infections nosocomiales**

|                  | Agents pathogènes               | Prévalence   |
|------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>Bactéries</b> | <i>S. aureus</i>                | <b>14.0%</b> |
|                  | <i>P. aeruginosa</i>            | <b>8.0%</b>  |
|                  | <i>K. pneumoniae</i>            | <b>7.0%</b>  |
|                  | <i>Acinetobacter</i> spp        | <b>7.0%</b>  |
|                  | <i>Serratia</i> spp             | <b>6.0%</b>  |
|                  | <i>Salmonella</i> spp           | <b>4.0%</b>  |
|                  | <i>Legionella pneumophila</i>   | <b>3.0%</b>  |
| <b>Fungi</b>     | <i>Aspergillus</i> spp          | <b>2.0%</b>  |
| <b>Virus</b>     | HBV *                           | <b>4.8%</b>  |
|                  | HCV **                          | <b>3.4%</b>  |
|                  | HAV ***                         | <b>1.8%</b>  |
|                  | Norovirus                       | <b>2.0%</b>  |
|                  | Influenza / Parainfluenza virus | <b>2.0%</b>  |
|                  | Rotavirus                       | <b>2.0%</b>  |
|                  | Adenovirus                      | <b>1.0%</b>  |
|                  | Autres                          | <b>32.0%</b> |

\* HBV : virus de l'hépatite B

\*\* HCV : virus de l'hépatite C

\*\*\* HAV : virus de l'hépatite A

D'après un rapport de l'ECDC, datant de 2008 (63)

Prévalences des pathogènes impliqués dans les épisodes épidémiques d'IN. Moins fréquentes que les IN endémiques, cela concerne tout de même environ 10% des IN.

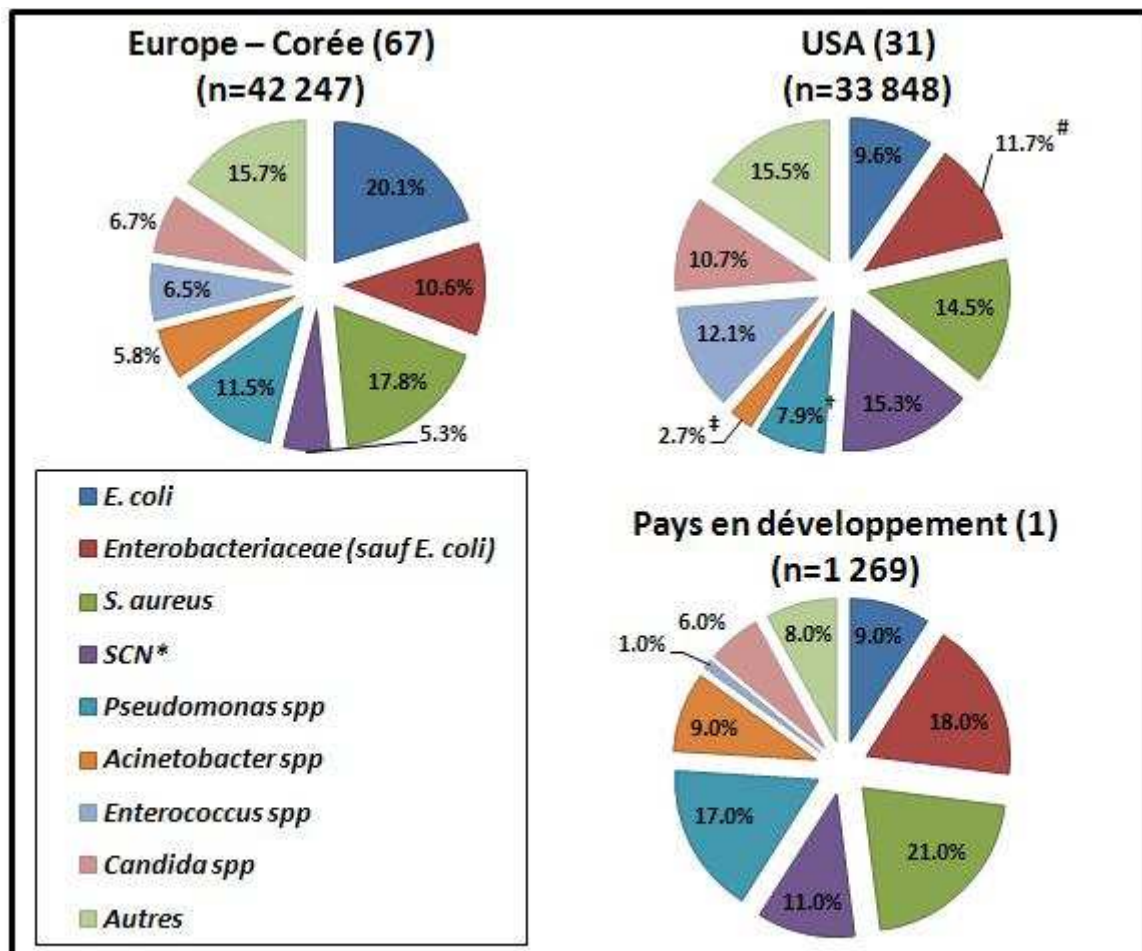
En Europe, les Entérobactéries sont les pathogènes principaux (30,7%), avec l'espèce *Escherichia coli* à elle seule isolée dans environ un prélèvement sur cinq (67). *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* spp sont quant à eux isolés respectivement dans 17,8% et 11,5% des cas. La prévalence du pathogène fongique le plus fréquent, *Candida* spp, est de 6,7% (figure 4).

Outre-Atlantique, les Entérobactéries sont plus rarement isolées (21,3%) et la prévalence d'*E. coli* est deux fois plus faible qu'en Europe. Les bactéries à Gram positif sont plus



fréquentes, avec des prévalences pour *S. aureus* et les **Staphylococci coagulase négatif** (SCN) chacune proche de 15%, et *Enterococcus spp* retrouvé dans 12,1% des cas. *Candida spp* y est également plus présent, avec 10,7% des cas (figure 4). Toutefois, ces données américaines ne prennent en compte que les infections nosocomiales DM-associées ou du site opératoire qui, si elles sont les plus fréquentes, ne couvrent pas l'ensemble des IN (31). Le système américain de surveillance des pathogènes et de leurs résistances aux antibiotiques, le National Healthcare Safety Network (NHSN), est en effet concentré sur le contrôle de ces types d'IN.

**Figure 4 : Prévalence des pathogènes responsables d'infections nosocomiales**



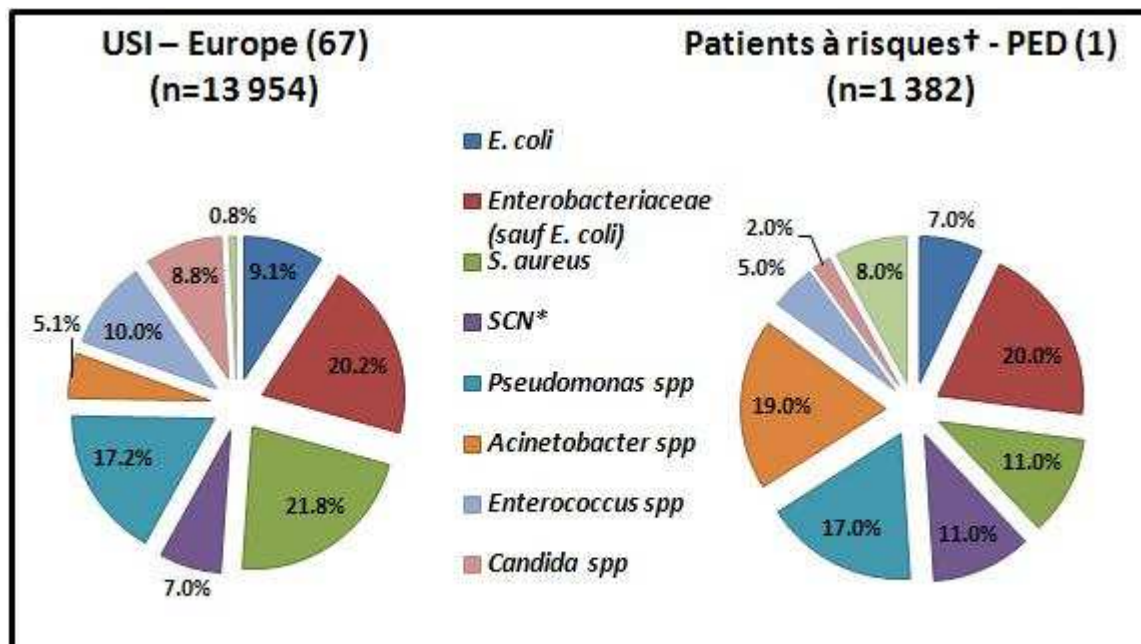
\*SCN : Staphylococci coagulase négatif; † *P. aeruginosa* seulement; ‡ *A. baumannii* seulement.  
 # Données regroupant les fréquences de *K. pneumoniae* (5,8%), *K. oxytoca* (1,1%) et *Enterobacter spp* (4,8%) seulement, le reste des *Enterobacteriaceae* étant classés dans "Autres".

Pour les PED (1), outre les Entérobactéries et les Staphylocoques, dont les prévalences sont comparables à celles retrouvées aux USA ou en Europe (respectivement 27% et 32%), deux genres sont plus fréquemment isolés que dans les PID: *Pseudomonas* spp (17%) et *Acinetobacter* spp (9%) (figure 4). Cela n'est pas négligeable, puisque les espèces appartenant à ces genres ont souvent des profils de **multi-résistances aux antibiotiques**, surtout *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

### 1.3.2. Les infections nosocomiales au sein des USI

En Europe, les IN contractées dans les USI sont causées dans un peu plus de deux cas sur trois par les *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* ou *Pseudomonas* spp (figure 5). Si *E. coli* est retrouvé moins fréquemment que dans l'ensemble des IN (9,1% dans les USI contre 20,1% pour l'ensemble de l'hôpital), les genres *Klebsiella* et *Enterobacter* y sont plus présents (67).

**Figure 5 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections nosocomiales au sein des USI**



\*SCN : Staphylococci coagulase négatif.

†Patients à risques : regroupe les patient en USI, les patients brûlés et les patients transplantés.

Dans les PED (1), pour les populations à risques (patients des USI, ainsi que patients brûlés ou transplantés), les bactéries à Gram positif semblent être moins fréquentes qu'en Europe (~27% dans les PED, contre ~39% pour les USI européennes). Les *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp* et *Pseudomonas spp* sont les pathogènes majoritaires, causant presque deux IN sur trois chez ces patients à risques (figure 5).

Il ne semble pas y avoir de variations conséquentes entre la flore microbienne présente dans les USI par rapport à celle de l'ensemble de l'hôpital, en Europe. Dans les PED, la fréquence de *S. aureus* diminue dans les USI, alors que celle du genre *Acinetobacter* y augmente, par rapport à l'ensemble de l'hôpital.

### 1.3.3. Les pathogènes causant les différents types d'infections nosocomiales

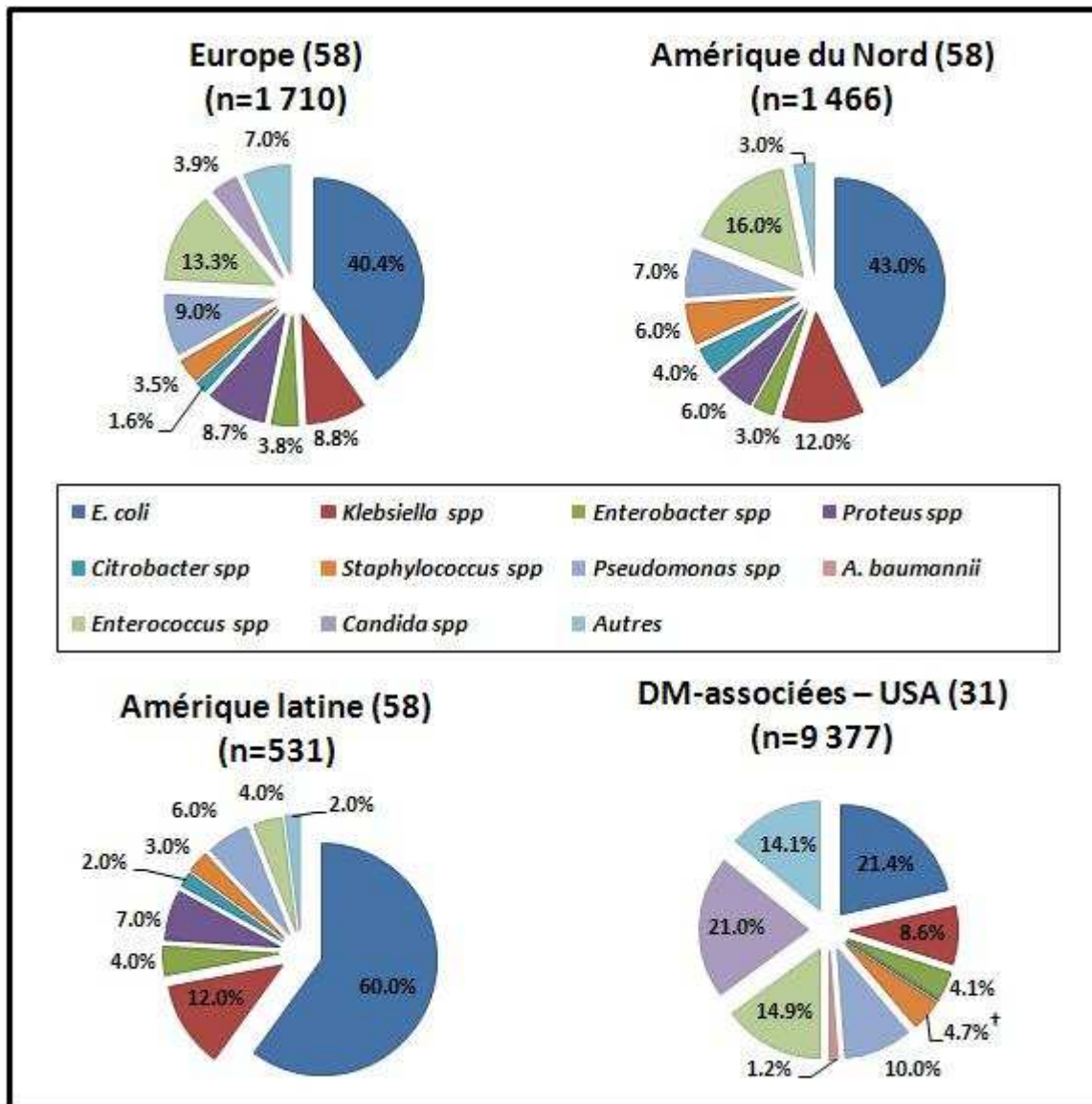
La prévalence des pathogènes responsables des IN au niveau des hôpitaux ou des USI, si elle a son intérêt pour le suivi par les instituts d'hygiène et de veille sanitaire, n'a pas un impact suffisant pour les cliniciens. En effet, pour chaque type d'infection, si les micro-organismes retrouvés sont les mêmes, les prévalences de chacun peuvent beaucoup varier. Il est donc important de **connaître les pathogènes impliqués préférentiellement dans chacun des types d'IN**, pour qu'il y ait une réelle influence de ce suivi épidémiologique au niveau de la **prise en charge des patients**.

#### *Infections urinaires nosocomiales*

**Pour les infections urinaires nosocomiales, le pathogène principal est sans conteste *E. coli***, avec une prévalence aux alentours de 40% pour les PID, et jusqu'à 60% en Amérique latine (58). *Enterococcus spp* semble quant à lui être un pathogène des PID, puisqu'on le retrouve dans environ 15% des cas en Europe et aux USA, et seulement 4% en Amérique Latine. Parmi les germes isolés relativement fréquemment figurent *Klebsiella spp*, qui est

retrouvé dans environ 10% de ces IN, ainsi que *Proteus* spp et *Pseudomonas* spp dans plus ou moins 7% des cas (figure 6).

**Figure 6 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections urinaires nosocomiales**



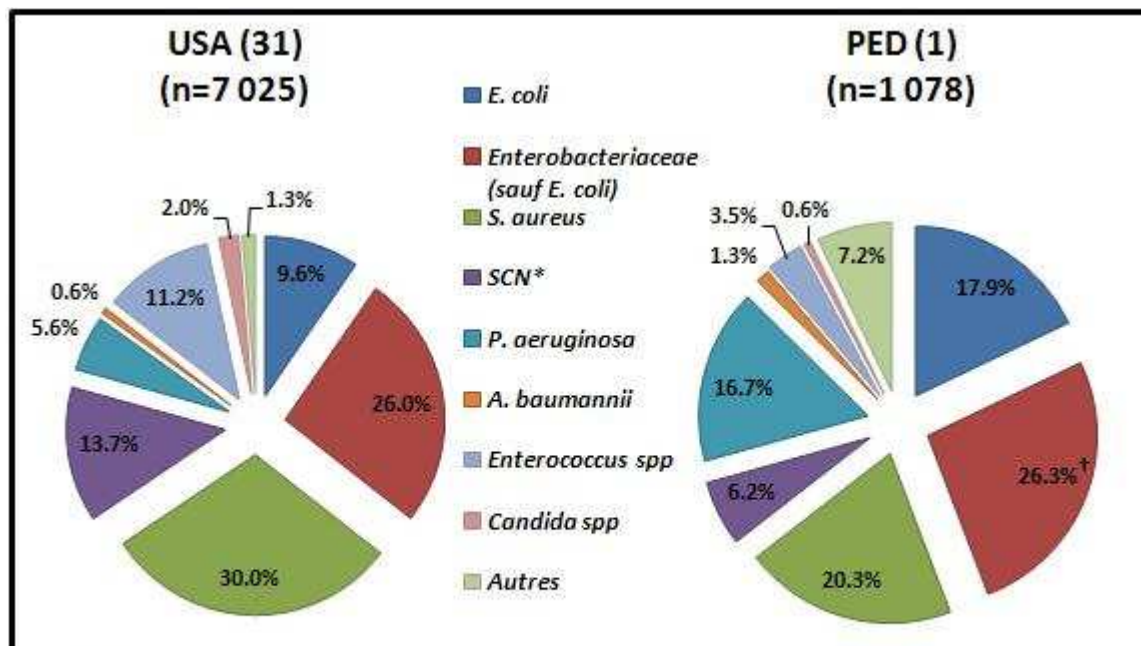
† Prévalences de *S. aureus* (2,2%) et des Staphylococci coagulase négatif (2,5%).

Lorsque les **infections urinaires** sont **DM-associées**, la fréquence d'*E. coli* est deux fois plus faible, avec une prévalence autour de 21% aux USA, soit autant que celle de *Candida* spp (figure 6). Les prévalences d'*Enterococcus* spp et de *Pseudomonas* spp restent constantes, respectivement 14,9% et 10%.

### Infections du site opératoire

Dans le deuxième type d'IN les plus fréquentes, les **infections du site opératoire**, le genre **Staphylococcus** est le plus prévalent, avec en première ligne *S. aureus* (30%), puis les SCN (13,7%), aux USA (1). Les *Enterobacteriaceae* (35,6%) sont relégués au deuxième rang, *E. coli* étant isolé dans 9,6% des cas, suivi par le genre *Enterococcus* (11,2%). **Dans les PED, la première étiologie reste les *Enterobacteriaceae*** avec une prévalence de 44,2% (dont 17,8% pour *E. coli*). Viennent ensuite les genres *Staphylococcus* (20,3% des cas dus à *S. aureus*) et *Pseudomonas* (16,3%) (figure 7).

Figure 7 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections du site opératoire



\*SCN : Staphylococci coagulase négatif.

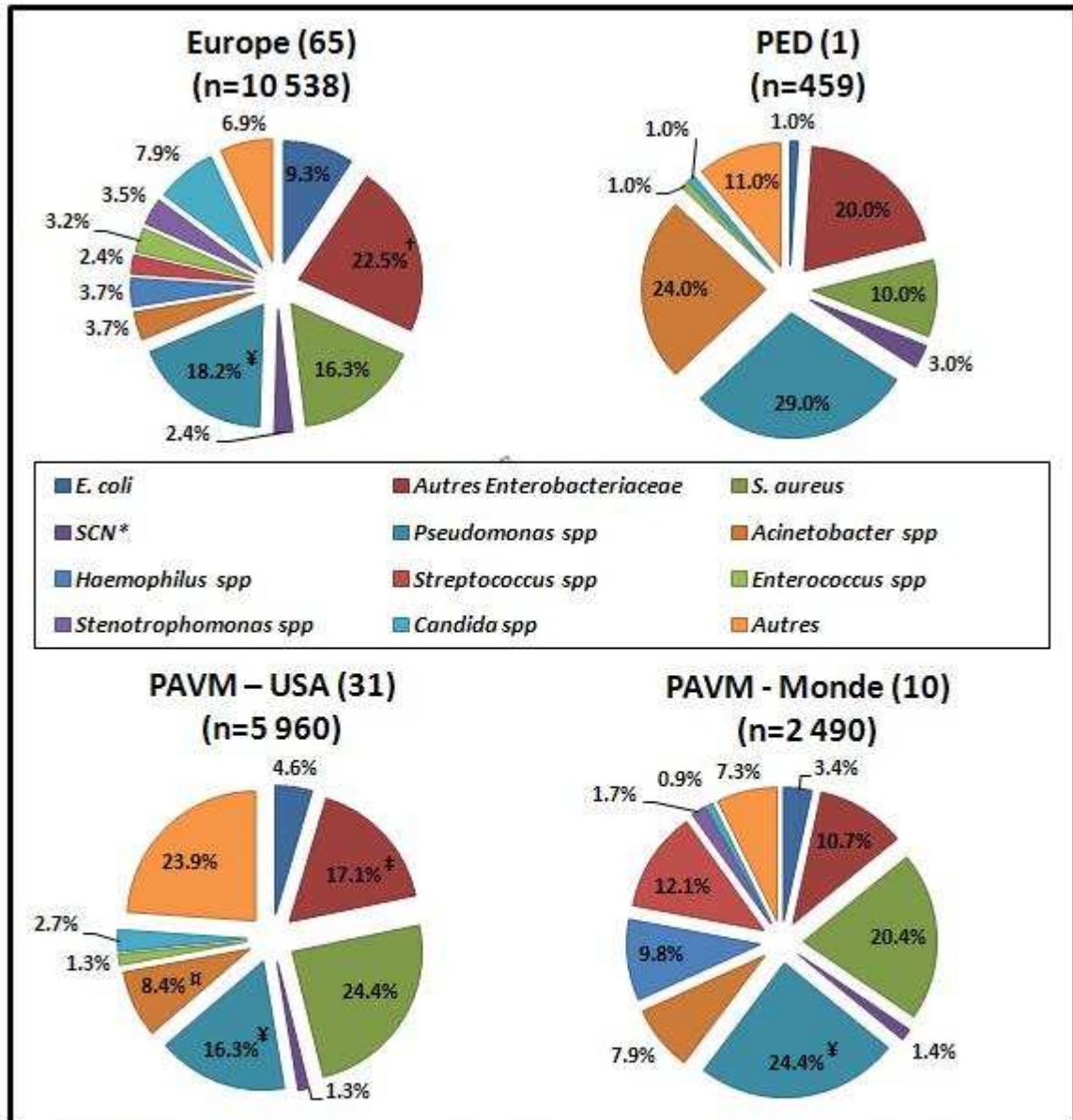
† Données regroupant les fréquences de *Klebsiella spp* (3,7%) et *Enterobacter spp* (4,2%) seulement, le reste des *Enterobacteriaceae* étant classées dans "Autres"

### Pneumopathies nosocomiales

En Europe, les pneumopathies nosocomiales sont causées majoritairement par les *Enterobacteriaceae* (31,8%), *P. aeruginosa* (18,1%) et *S. aureus* (16,3%) (65). Le profil microbien de ces pneumopathies est **différent pour les PED**, avec 29% des cas causés par

le genre *Pseudomonas*, 24% par le genre *Acinetobacter*, et 21% seulement par les *Enterobacteriaceae* (figure 8).

Figure 8 : Prévalences des pathogènes responsables d'infections pulmonaires nosocomiales



\*SCN: Staphylococci coagulase négatif; ¥ *P. aeruginosa* seulement; ¶ *A. baumannii* seulement.  
 † Données regroupant les fréquences de *Klebsiella spp* (8,1%), *Enterobacter spp* (7,1%), *Serratia spp* (2,8%), *Proteus spp* (2,7%) et *Citrobacter spp* (1,8%), le reste des *Enterobacteriaceae* étant classées dans "Autres".  
 ‡ Données regroupant les fréquences de *Klebsiella spp* (9,7%) et *Enterobacter spp* (8,4%) seulement, le reste des *Enterobacteriaceae* étant classées dans "Autres".

**Pour les PAVM, *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont les étiologies principales**, avec chacune environ 20% des infections à leur compte (10,31). Les *Enterobacteriaceae* sont retrouvés assez fréquemment (14% à 22% environ). Les pathogènes des genres *Haemophilus* et *Streptococcus* ont également un certain poids dans les PAVM (respectivement 9,8% et 12,1% des infections) (figure 8).

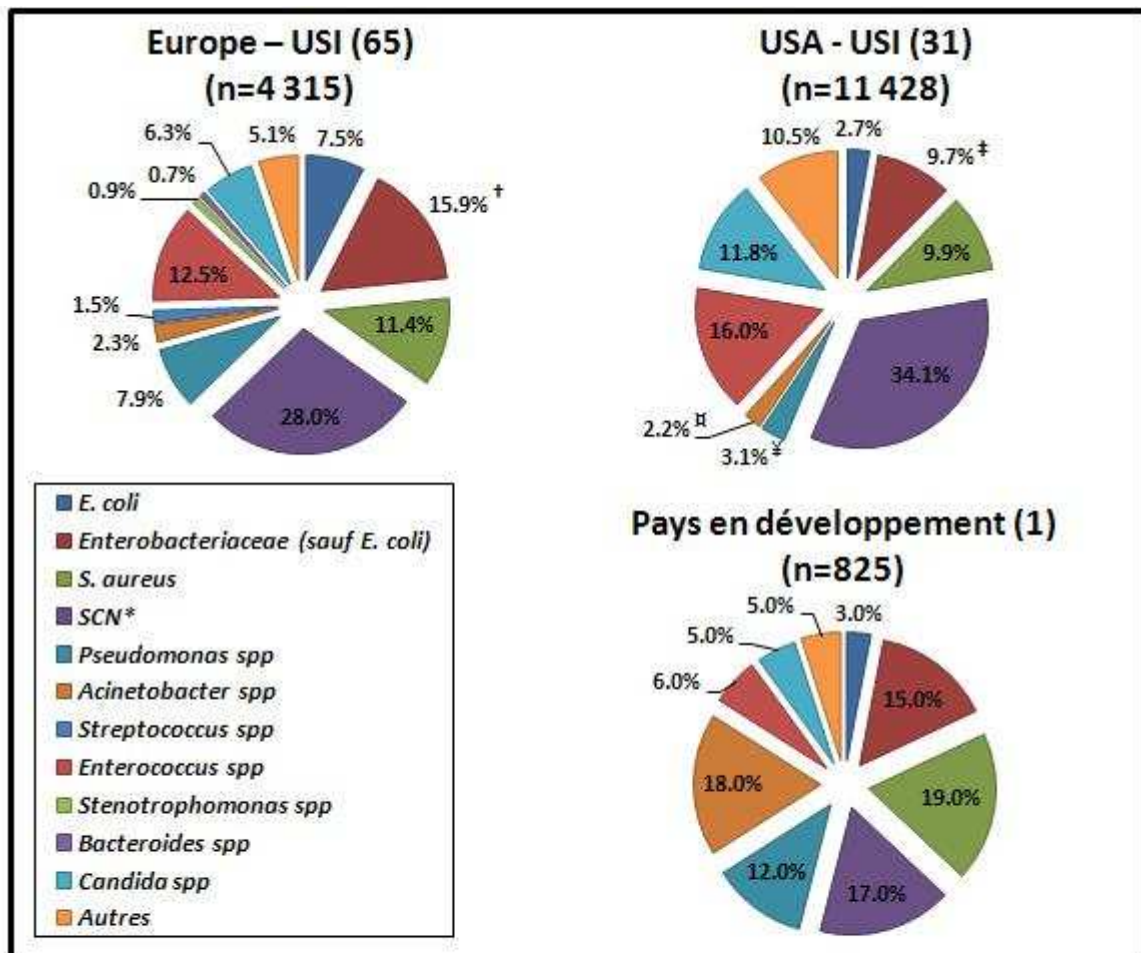
### **Septicémies nosocomiales**

**La septicémie**, le dernier des types d'IN les plus fréquents, **est causée dans environ 40 % des cas par des pathogènes appartenant au genre *Staphylococcus*** (figure 9), surtout par les SCN, qui représentent  $\frac{3}{4}$  des staphylocoques isolés en Europe (65) et aux USA (31), et la moitié dans les PED (1). Les prévalences varient ensuite selon les régions. En Europe, les *Enterobacteriaceae* constituent le second groupe de pathogènes les plus fréquents (23,4% dont 7,5% pour *E. coli*), suivi du genre *Enterococcus* spp. Aux USA, le genre *Enterococcus* est la deuxième étiologie des septicémies nosocomiales (16%), suivi par les *Enterobacteriaceae* et *Candida* spp, (environ 12% tous deux). Dans les PED, le genre *Acinetobacter* et les *Enterobacteriaceae* comptabilisent chacun environ 18% des septicémies nosocomiales, suivis par le genre *Pseudomonas* (12%).

### ***Clostridium difficile* :**

Il y a un pathogène qui n'est pas ou très peu mentionné dans les rapports de suivi des IN, que ce soient ceux de l'OMS, de l'ECDC ou encore du CDC, alors qu'il joue un rôle non négligeable dans ces infections : ***Clostridium difficile***. Cela est surprenant, puisqu'il s'agit de la principale cause de **diarrhées nosocomiales chez l'adulte**, dans les pays industrialisés (4), et beaucoup de cas d'épidémies nosocomiales ont été recensés récemment en Amérique du nord et en Europe (4,19,34,39,41,44,57). Ce pathogène étant la principale cause de diarrhées associées aux antibiotiques, ces épidémies sont en général associées à une augmentation de leur prescription au sein des hôpitaux touchés (41,44).

Figure 9 : Prévalences des pathogènes responsables de septicémies nosocomiales



\* SCN : Staphylococci coagulase négatif; ¥ *P. aeruginosa* seulement; ¤ *A. baumannii* seulement.  
 † Données regroupant les fréquences de *Klebsiella spp* (5,8%), *Enterobacter spp* (5,5%), *Serratia spp* (2,0%), *Proteus spp* (1,2%) et *Citrobacter spp* (0,7%), le reste des *Enterobacteriaceae* étant classées dans "Autres".  
 ‡ Données regroupant les fréquences de *Klebsiella spp* (9,7%) et *Enterobacter spp* (3,9%) seulement, le reste des *Enterobacteriaceae* étant classées dans "Autres".

#### 1.4. Les résistances aux antibiotiques

Ce qui distingue les IN des infections communautaires, c'est le **fort taux de résistances aux antibiotiques** parmi les pathogènes impliqués. La **pression de sélection**, qui est à la base de l'émergence de ces résistances, est en effet plus forte au sein des hôpitaux. La prévalence des résistances diffère selon les pathogènes.



**Tableau III : Résumé des pathogènes les plus fréquemment isolés dans les infections nosocomiales, selon le type d'infection et la région**

|  | Pays industrialisés |  |              |                     |  |              | Pays en voie de développement |  |              | Infections DM-associées (USA) |  |              |
|--|---------------------|--|--------------|---------------------|--|--------------|-------------------------------|--|--------------|-------------------------------|--|--------------|
|  | Europe              |  |              | USA                 |  |              | N (isolats)                   | Pathogènes                             | %            | N (isolats)                   | Pathogènes                             | %            |
|  | N (isolats)         | Pathogènes                             | %            | N (isolats)         | Pathogènes                             | %            |                               |  |              |                               |  |              |
| <b>Ensemble des infections nosocomiales</b>    | 42 247              | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>30.7%</b> | 33 848              | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | <b>29.8%</b> | 1 269                         | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | <b>32.0%</b> |                               | Non renseigné                          |              |
|  |                     | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | 23.1%        |                     | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 21.3%        |                               | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 27.0%        |                               |  |              |
|  |                     | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 11.5%        |                     | <i>Enterococcus spp</i>                | 12.1%        |                               | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 17.0%        |                               |  |              |
| <b>Infections nosocomiales au sein des USI</b> | 13 954              | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>29.3%</b> |                     | Non renseigné                          |              | 1 382                         | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>27.0%</b> |                               | Non renseigné                          |              |
|  |                     | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | 28.8%        |                     |  |              |                               | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | 22.0%        |                               |  |              |
|  |                     | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 17.2%        |                     |  |              |                               | <i>Acinetobacter spp</i>               | 19.0%        |                               |  |              |
| <b>Infections urinaires</b>                    | 1 710               | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>63.3%</b> | 1 466*              | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>68.0%</b> | 531**                         | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>85.0%</b> | 9 377                         | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>34.1%</b> |
|  |                     | <i>Enterococcus spp</i>                | 13.3%        |                     | <i>Enterococcus spp</i>                | 16.0%        |                               | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 6.0%         |                               | <i>Candida spp</i>                     | 21.0%        |
|  |                     | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 9.0%         |                     | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 7.0%         |                               | <i>Enterococcus spp</i>                | 4.0%         |                               | <i>Enterococcus spp</i>                | 14.9%        |
| <b>Infections du site opératoire</b>           |                     | Non renseigné                          |              | 7 025               | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | <b>43.7%</b> | 1 078                         | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>44.2%</b> |                               | Non renseigné                          |              |
|  |                     |  |              |                     | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 35.6%        |                               | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | 26.5%        |                               |  |              |
|  |                     |  |              |                     | <i>Enterococcus spp</i>                | 11.2%        |                               | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 16.7%        |                               |  |              |
| <b>Infections pulmonaires</b>                  | 10 538              | <i>Enterobacteriaceae</i>              | <b>31.8%</b> |                     | Non renseigné                          |              | 459                           | <i>Pseudomonas spp</i>                 | <b>29.0%</b> | 5 960                         | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | 25.7%        |
|  |                     | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | 18.7%        |                     |  |              |                               | <i>Acinetobacter spp</i>               | 24.0%        |                               | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 21.7%        |
|  |                     | <i>Pseudomonas spp</i> ‡               | 18.2%        |                     |  |              |                               | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 21.0%        |                               | <i>Pseudomonas spp</i> ‡               | 16.3%        |
| <b>Septicémies</b>                             | 4 315 <sup>♠</sup>  | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | <b>39.4%</b> | 11 428 <sup>♠</sup> | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | <b>44.0%</b> | 825                           | <i>Staphylococcus spp</i> <sup>†</sup> | <b>36.0%</b> |                               | Non renseigné                          |              |
|  |                     | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 23.4%        |                     | <i>Enterococcus spp</i>                | 16.0%        |                               | <i>Acinetobacter spp</i>               | 18.0%        |                               |  |              |
|  |                     | <i>Pseudomonas spp</i>                 | 7.9%         |                     | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 12.4%        |                               | <i>Enterobacteriaceae</i>              | 18.0%        |                               |  |              |
|  |                     |  |              |                     | <i>Candida spp</i>                     | 11.8%        |                               |  |              |                               |  |              |

(D'après les références 1,31,58,65 et 67)

† *S. aureus* + Staphylococci coagulase négatif ; ‡ *P. aeruginosa* seulement ; \* Amérique du Nord ; \*\* Amérique latine ; <sup>♠</sup> Infections au sein des USI.

La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe plusieurs genres contenant des espèces pathologiques, fréquemment responsables d'IN. La bactérie *E. coli* est celle avec la plus forte prévalence, mais les genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia* et *Citrobacter* rassemblent des pathogènes régulièrement isolés dans les IN.

Le terme *Staphylococcus spp* ne prend ici en compte que l'espèce *S. aureus* et les *Staphylococci* coagulase négatif, qui sont les principaux pathogènes de ce genre.

Chez les bactéries à Gram positif, on retrouve les ***S. aureus* résistants à la méticilline** (SARM), les **Enterococci résistants à la vancomycine** (ERV) ou encore les ***Streptococcus pneumoniae* non-sensibles à la pénicilline** (SPNP) (63). A noter également les forts taux de résistance chez ***C. difficile*** (4).

Du côté des bactéries à Gram négatif, en plus du fort taux de résistances par la production de **béta-lactamase à spectre étendu** (BLSE), le nombre de souches d'***E. coli* résistantes aux fluoroquinolones** est important et en augmentation, ce qui complique la prise en charge des infections urinaires, causées majoritairement par ce pathogène. En effet, si le traitement de première intention des infections urinaires est une association Sulfamides et triméthoprimine, les fluoroquinolones sont souvent utilisées pour les cas les plus sévères ou lors de la suspicion de résistances. Les souches de ***Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes** sont de plus en plus fréquentes, et environ 1/5 des souches de ***P. aeruginosa*** sont résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques (63). La bactérie ***A. baumannii***, si elle a une prévalence relativement faible dans les IN, est l'une des bactéries les plus résistantes aux antibiotiques (46).

#### 1.4.1. Réseaux de surveillance des résistances aux antibiotiques

Les données qui suivent proviennent en grande majorité de rapports européens et américains de surveillance des résistances aux antibiotiques. Pour l'Europe, l'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), dépendant de l'ECDC et successeur de l'European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), recueille chaque année les données en provenance de 28 pays européens (64). Sept pathogènes sont ainsi suivis par ce réseau : *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Pour les USA, le NHSN, dépendant du CDC, recueille les données de 463 hôpitaux (31). En revanche, ces données

ne concernent que les IN DM-associées ou les infections du site opératoire. Le suivi des résistances cible les mêmes pathogènes que l'EARS-Net.

Les données ont été complétées avec des publications pour *A. baumannii* (27,46) et *C. difficile* (4,19,39,41,44,57).

#### 1.4.2. *Staphylococcus aureus*

La **résistance à la méticilline** est retrouvée en moyenne pour 19,7% des isolats de *S. aureus*, en Europe. La prévalence y est supérieure à 25% dans 10 pays, atteignant même 58,1% à Malte. Aux USA, elle est de 56,2% dans les infections DM-associée, et de 49,2% dans les infections du site opératoire. Il est important de noter toutefois une **stabilisation ou même une diminution significative de la proportion de SARM** par rapport aux *S. aureus* sensibles dans plusieurs pays européens, entre 2006 et 2009. La prévalence de SARM était de 21,5% en moyenne en Europe en 2006.

Une **résistance à la rifampicine** est également retrouvée chez *S. aureus*, principalement chez les **souches déjà résistantes à la méticilline** : 3,4% des SARM sont également résistants à cet antibiotique, contre 0,3% parmi les souches sensibles à la méticilline.

#### 1.4.3. *Enterococcus spp*

Les entérocoques, qui **possèdent déjà plusieurs résistances naturelles** (céphalosporines, sulfamides et à plus faible niveau aminosides), peuvent en plus acquérir des **résistances à l'ampicilline et à la vancomycine** (ERV). Une résistance de haut niveau contre l'ampicilline est souvent retrouvée chez *E. faecalis*. La prévalence en Europe varie de 15% des isolats (Islande) jusqu'à 66% (Chypre), et elle est supérieure à 25% dans 22 des 28 pays ayant rapportés au réseau EARS-Net. La résistance à la vancomycine est plutôt retrouvée chez *E. faecium* : 80% des souches portent cette résistance aux USA, dans les IN DM-associées, contre 6.9% pour *E. faecalis*. En Europe, seulement huit pays sur vingt-six

rapportent une prévalence d'*E. faecium* résistants à la vancomycine supérieure à 10%. Sept pays, dont la France, ont même une prévalence inférieure à 1%.

#### 1.4.4. *Streptococcus pneumoniae*

Pour cette bactérie, des résistances ont été décrites contre les pénicillines et contre les macrolides. Les **SPNP** (sensibilités à la pénicilline : intermédiaires et résistants) représentaient en moyenne 7,5% des souches isolées en Europe en 2009, mais la prévalence est supérieure à 25% dans 5 pays, dont la France et la Bulgarie. Les SPNP étaient **résistants à la pénicilline** dans 41,5% de ces cas en moyenne. Quant à la **résistance aux macrolides**, elle concerne 13,4% des *S. pneumoniae* (SPNM) en moyenne, avec une prévalence au-dessus de 25% dans 5 pays, dont la Finlande, la Bulgarie et la France. Il y a, en Europe, environ 5% de souches en moyenne de *S. pneumoniae* qui sont non-sensibles aux deux classes d'antibiotiques. Dans deux pays, la prévalence y est supérieure à 25% : en Bulgarie et à Chypre.

#### 1.4.5. *Clostridium difficile*

En Europe, les proportions de souches de *C. difficile* **résistantes aux macrolides, aux lincosanides, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones** sont respectivement de 44,4%, 46,1%, 9,2% et 37,5%. De plus, 36,4% des souches sont résistantes à la fois aux macrolides et aux fluoroquinolones (4).

Une souche particulièrement virulente a fait son apparition au Canada en 2003 (19,44), et s'est maintenant répandue aux USA, au Japon et en Europe (34,39,41,57). Cette souche, le ribotype 027 ou pulsotype NAP1 (pour National American Pulsotype 1), est fortement résistante aux fluoroquinolones et à l'érythromycine (100% des isolats), mais sensible à la clindamincine (lincosanide) ainsi qu'à la vancomycine et au metronidazole (anti-

anaérobies). Le taux de mortalité dans les infections dues à cette souche est élevé, entre 15% et 20% (39).

#### 1.4.6. *Escherichia coli*

**La proportion d'*E. coli* résistants aux antibiotiques a considérablement augmenté** au cours de la dernière décennie, et l'émergence de souches combinant des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques est de plus en plus fréquente. En Europe, alors que 51% environ des souches d'*E. coli* étaient sensibles aux quatre classes d'antibiotiques en 2002, il n'y en avait plus que 43,4% en 2009. La proportion de souches résistantes à deux classes d'antibiotiques stagne aux environs de 12% depuis 2006, alors qu'elle était de 8% en 2002. **La prévalence de souches résistantes à trois classes d'antibiotiques a doublé en sept ans, et a été multipliée par cinq environ pour celles résistantes aux quatre classes** (respectivement 6,1% et 3,3% des isolats, en 2009).

La **résistance aux aminopénicillines** est la plus répandue (54,3% des isolats en Europe, en 2009). Elle est soit l'unique résistance de la souche (33,3% des souches), soit associée avec une ou plusieurs autres résistances. Elle est fréquemment combinée à la **résistance aux fluoroquinolones** (84,8% des souches multi-résistantes), qui est la deuxième résistance la plus fréquente avec une prévalence supérieure à 20% dans 16 pays européens sur 28. Aux USA, la résistance aux fluoroquinolones varie entre 22,7% et 30,8% des souches dans les IN DM-associées et du site opératoire.

La **résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G)**, si elle est la moins fréquente, avec 7,4% en moyenne en Europe contre 8,4% des souches pour la **résistance aux aminosides**, a vu sa prévalence augmenter significativement dans 16 des 28 pays européens, entre 2006 et 2009. Aux USA, elle comptabilise entre 5% et 11% des souches impliquées dans les IN DM-associées et du site opératoire.

Avec l'émergence de **souches produisant des carbapénémases** (1% à 4% des souches des IN DM-associées et du site opératoire aux USA), la prise en charge des patients atteints d'IN va devenir de plus en plus compliquée dans les prochaines années, au vu de la prévalence d'*E. coli* dans ces infections.

#### 1.4.7. *Klebsiella pneumoniae*

Comme pour *E. coli*, *K. pneumoniae* peut acquérir de multiples résistances. Cette bactérie possède une résistance naturelle aux aminopénicillines, et elle **acquiert fréquemment de nouvelles carbapénémases**, comme par exemple les enzymes de type KPC, VIM ou plus récemment NDM-1. Celles-ci sont **surtout retrouvées aux USA**, où la prévalence y est de 3,6% à 10,8% des souches impliquées dans les IN DM-associées et du site opératoire. En Europe, la Grèce est la plus touchée, avec plus de 25% des souches résistantes aux carbapénèmes, alors que dans les autres pays elles ne dépassaient que rarement 1%, en 2009.

Environ une souche sur cinq aux USA et plus d'un tiers des souches isolées en Europe sont **résistantes aux C3G**. Les pays européens rapportant les prévalences les plus élevés, outre le Portugal, sont situés en Europe centrale, entre la Lettonie au nord et la Grèce au sud. Cette région est également celle comptant le plus fort taux de *K. pneumoniae* **résistantes aux fluoroquinolones et aux aminosides** (respectivement 28,2% et 23,4% en moyenne, pour l'Europe).

Parmi les souches de *K. pneumoniae* résistantes à au moins une classe d'antibiotiques, ce sont celles combinant les **résistances aux trois classes qui sont les plus fréquentes** (55% des souches résistantes). Suivent ensuite les souches résistantes à deux classes (environ 25%, elles sont résistantes aux fluoroquinolones et aux C3G dans la moitié de ces cas), puis, le plus rarement, les mono-résistantes (20%).

Les données recensées entre 2006 et 2009 montrent une **augmentation très nette** de la fréquence de chaque résistance, ainsi que de celle des souches multi-résistantes (aux trois classes d'antibiotiques).

#### 1.4.8. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est résistant naturellement à un grand nombre d'antibiotiques. Les fluoroquinolones, quelques bêta-lactamines dont les carbapénèmes, et la colistine sont efficaces contre cette bactérie. Les résistances acquises contre ces quelques antibiotiques sont fréquentes, rendant la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* de plus en plus compliquée.

La **résistance aux fluoroquinolones** est la plus fréquente, suivie par celle aux **carbapénèmes** (respectivement 22,8% et 19,0% en Europe, 30,7% et 25,3% pour les IN DM-associées et 15,9% et 11,8% pour les infections du site opératoire, aux USA). Les **résistances aux aminosides**, à la **Pipéracilline associée au Tazobactam** ou encore au **Ceftazidime (C3G)** concernent chacune environ 15% des souches, en Europe. Aux USA, la résistance aux C3G est présente dans 17,5% des cas lors des IN DM-associées, 5,7% pour les infections du site opératoire.

Environ un tiers des souches sont résistantes à au moins une classe d'antibiotiques, et une sur six (la moitié des souches résistantes) l'est à trois classes ou plus. Le profil le plus souvent retrouvé, environ 5% des souches, est celui des **résistances simultanées aux cinq classes d'antibiotiques précédemment évoquées**.

En Europe, l'Europe centrale est la plus touchée par ces résistances (entre la Lettonie au nord et la Grèce au sud), ainsi que l'Italie, l'Espagne et le Portugal.

#### 1.4.9. *Acinetobacter baumannii*

Cette bactérie est connue pour son **adaptation et son acquisition rapide de résistances**. Alors qu'elle est naturellement sensible à la majorité des antibiotiques, des souches possèdent maintenant des **résistances à tous les antibiotiques**. La comparaison génomique de deux souches d'*A. baumannii*, l'une entièrement sensible et l'autre multi-résistante, a mis en évidence un élément clé dans l'acquisition de résistances par ce pathogène (27). Un îlot génomique flanqué de transposons, ne contenant aucun marqueur de résistance dans le cas de la souche sensible, comptait 45 gènes de résistances dans le cas de la souche multi-résistante. Ceux-ci étaient originaires de pathogènes comme *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp ou *Escherichia* spp. La bactérie, soumise à une pression de sélection par des antibiotiques, est donc capable d'assimiler de nombreuses résistances depuis son entourage via cet élément génomique, ce qui rend les IN causées par *A. baumannii* très difficiles à prendre en charge.

En Europe, environ 27% des souches sont **résistantes aux carbapénèmes**, les **résistances à la ceftazidime (C3G) et à la ciprofloxacine (fluoroquinolones)** sont retrouvées chacune chez environ 66% des souches, et plus de 50% des isolats sont **résistants à la gentamicine (aminoside)**. En Amérique du nord, les proportions de souches résistantes aux C3G, aux aminosides et aux fluoroquinolones sont plus faibles, 35 à 40%, 10% à 30% et 35% à 40%, respectivement (46). Entre 25% et 37% des souches responsables d'IN DM-associée ou du site opératoire sont résistantes aux carbapénèmes (31). En Amérique latine, le taux de résistance à ces derniers antibiotiques atteint presque 30%. En Asie et Moyen orient, 25% des souches sont résistantes aux carbapénèmes, 40% aux C3G, 40% à l'ampicilline associée au sulbactam (aminopénicilline + inhibiteur de bêta-lactamases), 35% aux aminosides et 45% aux fluoroquinolones (46).



## 1.5. Impact humain et économique des infections nosocomiales

**La mortalité strictement imputable aux IN est difficile à évaluer**, les patients étant hospitalisés pour une autre pathologie, et il n'est pas toujours aisé de distinguer les causes des décès, souvent d'origines multifactorielles. En revanche, il est plus facile d'estimer les **morbidités associées au développement d'une IN**. Celles-ci se traduisent par l'augmentation de la durée d'hospitalisation, des durées d'intubation et/ou de port de cathéter s'il y a lieu, par une période de convalescence allongée et parfois par des handicaps, temporaires ou permanents. **L'impact économique** de ces infections est également non négligeable, que ce soient les coûts directs associés à une durée de prise en charge plus longue, facilement évaluables, comme les coûts indirects, plus difficiles à estimer. Ces derniers prennent en compte le nombre de jours non travaillés par les patients, pendant l'hospitalisation et la convalescence, ou les soins ultérieurs qui pourraient être nécessaires.

En Europe, les IN seraient la cause de 37 000 décès sur les 4 131 000 patients qui sont touchés chaque année (mortalité de 0,9%), et contribueraient à 110 000 décès supplémentaires (mortalité de 3,6% au total) (63). Aux USA, la mortalité serait plutôt de 5,8%, ces décès étant principalement causés par les pneumopathies nosocomiales, les septicémies, les infections urinaires et les infections du site opératoire, comptant respectivement pour 36,3%, 31,0%, 13,2% et 8,3% des décès (38). **La mortalité associée aux IN dans les PID est estimée plus importante par l'OMS** : entre 12% et 80%, selon la population de patients touchée (67).

**La durée d'hospitalisation est augmentée de 4 jours en moyenne par patient, en Europe**, suite au développement d'une IN (67). Cela fait un total d'environ 16 millions de

jours supplémentaires d'hospitalisation par an. **Les coûts directs de cette prolongation sont de 7 milliards d'euros par an** (63), le coût moyen d'une journée d'hospitalisation étant estimé à 435 €. **Aux USA, ces coûts se sont élevés à US\$ 6,5 milliards pour l'année 2004** (67).

Pour les pays en voie de développement, il n'y a pas d'évaluation de la mortalité de l'ensemble des IN, mais seulement des types les plus fréquents. Ainsi, une étude recensant les données de 173 USI d'Amérique latine, d'Asie, d'Afrique et d'Europe rapporte des mortalités pour les PAVM, les septicémies DM-associées et les infections urinaires DM-associées de respectivement 29,3%, 23,6% et 18,5%. En Inde et en Argentine, des études ont évalué la mortalité pour ces mêmes IN à 19,0% et 35,0% pour les PAVM, 4,0% et 5,0% pour les septicémies DM-associées et à 11,6% et 25,0% pour les infections urinaires DM-associées, respectivement (67). **La durée d'hospitalisation est augmentée, dans les PED, de 5 à 29,5 jours**, ce qui représente des **surcoûts importants** pour ces pays qui ont déjà des **moyens limités** (67).

**Les IN pourraient pourtant être évitées dans 20% à 30% des cas** (30), aussi bien dans les pays industrialisés que dans les PED. Plus de la moitié des **septicémies nosocomiales DM-associées** pourraient être prévenues, par la sensibilisation aux mesures d'hygiène, des formations du personnel soignant à la pose des cathéters, et au remplacement plus fréquent de ceux-ci (28). Pareillement, une grande partie des **PAVM** pourraient être évitées, notamment par la mise en place de procédures associant des bains de bouche à la chlorhexidine, un antiseptique, et l'aspiration régulière des sécrétions endo-trachéales. Même mises en place individuellement, ces procédures permettraient la prévention de 31% à 57% des PAVM (29). Dans les PED, le **lavage des mains** est de plus en plus négligé, et environ 39% des injections sont faites avec du **matériel réutilisé**, faute de moyens, ce qui contribue grandement à l'émergence et à la propagation d'IN (1).

## 2. Diagnostic du laboratoire de microbiologie clinique

### 2.1. Intérêts d'un diagnostic rapide

Lorsque les signes cliniques d'un patient sont évocateurs du développement d'une IN, les cliniciens prescrivent un examen microbiologique pour l'identification du ou des pathogène(s) en cause, et de leur profil de résistances aux antibiotiques. Les **méthodes conventionnelles**, reposant sur la **culture**, l'identification **biochimique** et **phénotypique** et **l'antibiogramme**, sont **longues et laborieuses**. Un **examen direct** du prélèvement après coloration de Gram peut être réalisé précocement sur l'échantillon frais, ce qui donne déjà quelques indications aux cliniciens. En revanche, le seuil de détection de cet examen direct est d'environ  $10^4$  à  $10^5$  Unité Formant une Colonie par millilitre (UFC/mL) (73), selon le type d'échantillons, et il est très dépendant de la qualité du prélèvement et du temps d'acheminement de celui-ci jusqu'au laboratoire d'analyse. Cet examen est souvent réalisé après une étape de culture. Ainsi, pour des **résultats complets** il faut en général attendre **plus de 2 à 5 jours**, selon le pathogène et le type de prélèvement (60).

Si l'état général des patients le permet, il est préférable d'attendre ces résultats avant de commencer une **antibiothérapie ciblée**. Malheureusement ces cas sont rares. Le clinicien doit la plupart du temps mettre en place une **antibiothérapie probabiliste ou empirique** le plus tôt possible. Celle-ci repose sur des **critères cliniques, épidémiologiques et démographiques** dans un premier temps. Le **traitement est ensuite réadapté**, si besoin, lorsque l'identification et le profil de résistance du pathogène sont connus, ou dès que les résultats de l'examen direct sont obtenus, si les informations qu'il donne le permettent.

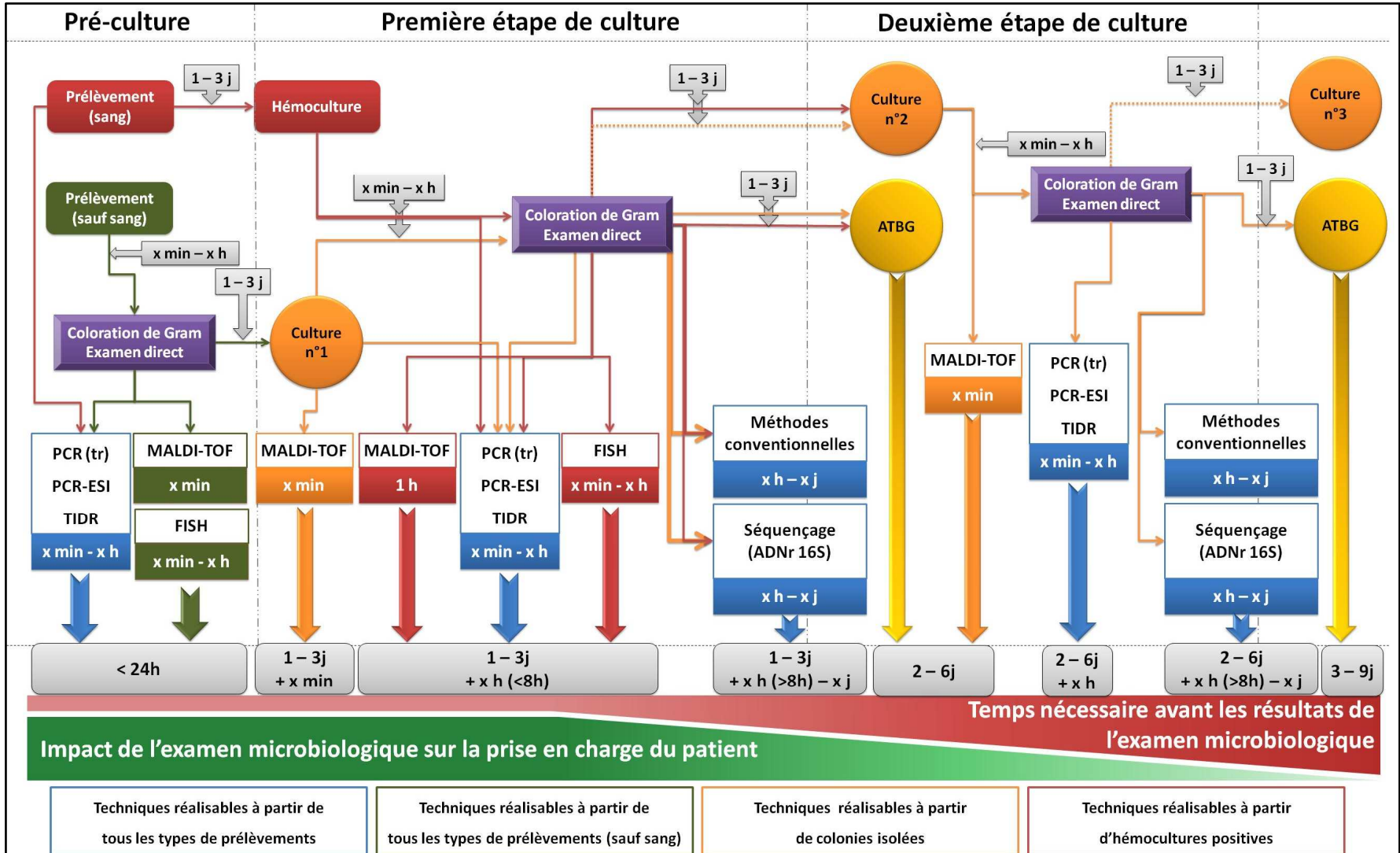
Des **résultats disponibles le jour même seraient très bénéfiques** pour le patient. En effet, une **antibiothérapie inadaptée ou mise en place tardivement** provoque des effets indésirables, une prolongation de l'hospitalisation, l'émergence de pathogènes résistants et

des surcoûts non négligeables, pour n'apporter **aucun bénéfice clinique** (5,15,26,60,62). Elle est également **associée à un excès de mortalité** par rapport à une antibiothérapie adaptée entamée plus précocement (5,14,15,26,40,54,61).

## 2.2. Techniques de diagnostic bactériologique rapides

Il y a donc un **intérêt majeur à identifier le pathogène le plus tôt possible**. Les méthodes conventionnelles ne permettent pas cette rapidité car elles manquent de sensibilité et sont basées sur l'amplification naturelle des pathogènes, ce qui prend du temps. Quelques techniques permettent une identification des bactéries, et dans certains cas de leur profil de résistances aux antibiotiques, dans des délais très réduits (figure 10). Parmi celles-ci figurent des **techniques de biologie moléculaire**, comme la **réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel** ou l'**hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)**. Il y a également les techniques de **spectrométrie de masse**, avec les technologies de **matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF)** et de **PCR couplée à la technique d'electrospray ionization (PCR-ESI)**. Seules ces quatre techniques seront décrites par la suite car elles sont **les plus rapides** ou ont **le potentiel pour le devenir**. Elles permettraient ainsi une **analyse en routine des échantillons dans les 24h suivant le prélèvement**. Quelques tests d'immuno-diagnostic rapides (TIDR) pourraient également être utilisés pour l'identification de bactéries et de marqueurs de résistances, mais le menu disponible pour le diagnostic des IN bactériennes est très limité, et leur utilisation est plutôt retrouvée en dehors du laboratoire d'analyse ("Point of Care"). Ils ne seront donc pas abordés plus avant dans cette thèse.

Figure 10 : Traitement des prélèvements au laboratoire de microbiologie clinique : techniques diagnostiques et délais avant résultats



Note : explication de la figure pages suivantes (min = minutes ; h = heure(s) ; j = jour(s) ; ATBG : antibiogramme ; PCR (tr) : PCR en temps réel)

### Prélèvements sanguins :

- **Etape pré-culture** : le nombre de bactéries vivantes dans ces prélèvements est compris entre 1 et 10 UFC/mL chez l'adulte, soit en-dessous du seuil de détection de l'examen direct. Une période de culture est donc nécessaire avant l'examen microscopique d'une coloration de Gram. Les techniques basées sur la PCR, qui détectent les acides nucléiques provenant des bactéries vivantes mais également ceux présents dans les cellules mortes ou circulant dans le sang, sont suffisamment sensibles pour être utilisées directement sur les prélèvements sanguins, sans étapes de cultures préalables.
- **Hémoculture** : seulement 10% à 15% des hémocultures montrent une croissance bactérienne, en 1 à 3 jours, et la moitié de ces cas environ sont dus à des contaminations du prélèvement. Les techniques basées sur la PCR peuvent être réalisées directement sur les hémocultures positives, alors qu'un examen direct avec coloration de Gram doit être réalisé avant de procéder aux tests de FISH et de spectrométrie de masse MALDI-TOF. Dans le premier cas, cet examen sert à définir le kit de FISH à utiliser alors que pour la spectrométrie de masse, il permet de s'assurer que le prélèvement est monomicrobien. Si c'est bien le cas, l'hémoculture positive est ensuite utilisée pour effectuer les tests d'identification phénotypique conventionnels et ensemercer des géloses, dont une servira pour l'antibiogramme. En revanche, si l'examen direct montre un échantillon polybactérien, un isolement de chacun des pathogènes doit être réalisé. Pour cela, une gélose est ensemencée puis mise à incuber 1 à 3 jours. Dès que la culture est positive, elle doit présenter des colonies d'aspects morphologiques différents. Chacun de ces types de colonie est utilisé pour les tests d'identification et de résistance, pour gagner du temps, mais il est important de réensemencer ces différentes colonies isolées pour vérifier qu'elles sont bien monobactérienne. Les géloses réensemencées doivent présenter des colonies ayant toutes le même aspect morphologique. Les tests d'identification phénotypique conventionnels ou par MALDI-TOF ainsi que l'antibiogramme ont une valeur diagnostique seulement s'ils sont réalisés sur un clone bactérien unique.

### **Autres prélèvements :**

- **Etape pré-culture :** tous les prélèvements autres que le sang contiennent potentiellement suffisamment de bactéries pour qu'un examen direct les détecte. Cette charge bactérienne dépend de la précocité de l'infection au moment du prélèvement, de la qualité de celui-ci et du temps et des conditions d'acheminement jusqu'au laboratoire de microbiologie clinique. L'examen direct, après coloration de Gram, permet l'utilisation des techniques de FISH et d'analyse MALDI-TOF si le prélèvement est monomicrobien. Les analyses par des techniques de PCR sont également réalisables directement sur les échantillons cliniques, et le résultat dépendra grandement de l'étape d'extraction des acides nucléiques, dont la performance diffère selon le type d'échantillon et la(es) bactérie(s). Des techniques de TIDR peuvent être utilisées pour détecter des antigènes solubles dans les urines ou les selles.
- **Culture des échantillons cliniques :** des géloses sontensemencées à partir des prélèvements. Un examen microscopique après coloration de Gram est réalisé sur les cultures positives (1 à 3 jours d'incubation), et les tests de diagnostic rapides et/ou conventionnels ainsi qu'un antibiogramme sont faits à partir de colonies isolées. Dans le cas où l'échantillon est polymicrobien, la procédure est la même que pour les hémocultures.

**L'intérêt clinique de l'examen microbiologique** est maximal lorsque l'identification est disponible pour le clinicien dans les 24 premières heures suivant le prélèvement. Une antibiothérapie adaptée mise en place précocement permet de réduire grandement la morbi-mortalité et les surcoûts hospitaliers des infections nosocomiales (voir "III.1. Intérêts d'un diagnostic rapide").

## 2.2.1. La PCR en temps réel

### 2.2.1.1. Description de la technique

La PCR en temps réel est une technique qui repose d'une part sur l'**amplification des acides désoxyribonucléiques** (ADN) par une ADN polymérase, à partir d'amorces sens et anti-sens, et d'autre part sur la **détection régulière d'un signal fluorescent émis par une sonde**, tout au long de la réaction (figure 11). Les amorces et la sonde, des oligonucléotides mesurant en général entre 15 et 30 bases, sont **spécifiques des séquences d'ADN** qui doivent être amplifiées. La technique peut également être utilisée pour détecter des **acides ribonucléiques** (ARN). Lorsque ceux-ci sont ciblés, une retro-transcriptase, c'est-à-dire une enzyme créant un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin d'ARN, est utilisée avant les étapes d'amplification proprement dite.

**Un cycle de PCR**, ou cycle d'amplification, est contrôlé par le **changement de température de la réaction** (figure 11A). Il est composé d'une étape de dénaturation de l'ADN, suivie de l'hybridation des amorces sur leur séquence spécifique et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase. Dernièrement, ces enzymes ont été optimisées de façon à ce que les étapes d'hybridation et d'extension aient lieu à une température commune, réduisant ainsi le nombre d'étapes par cycle de PCR et augmentant donc la rapidité de la détection des ADN cibles.

Le **niveau de fluorescence** au cours de chaque cycle de PCR est corrélé au **nombre de sondes se fixant sur leur ADN cible**. Le nombre de brins d'ADN cible étant doublé à chaque cycle (quand les conditions sont optimales), le signal fluorescent détecté augmente exponentiellement au cours de la réaction (figure 11B et C). C'est cette augmentation du signal qui permet d'**estimer la quantité de cibles initialement présente** dans l'échantillon, plus particulièrement le nombre de cycles de PCR qu'il faut pour observer un



signal fluorescent se détachant nettement du bruit de fond (figure 11B). Cette estimation se fait par rapport au nombre de cycles de PCR qu'il faut pour détecter un contrôle, c'est-à-dire une cible de concentration initiale connue amplifiée parallèlement à la réaction sans interférer avec celle-ci.

### **2.2.1.2. Performances de la PCR en temps réel**

Cette technique présente de nombreux avantages au niveau de la **sensibilité**, de la **spécificité**, de la **reproductibilité** et de la **vitesse de la réaction** (22,56). Le point fort de la PCR en temps réel est qu'elle permet l'identification d'un large panel de pathogènes **directement à partir des échantillons cliniques**. Les bactéries dont les conditions de cultures difficiles retardent habituellement la mise en évidence peuvent être identifiées en quelques heures avec cette méthode. En revanche, la présence de **nombreux inhibiteurs dans les échantillons cliniques** peut altérer les performances de la PCR. Les techniques d'**extraction des acides nucléiques** qui ont été développées permettent d'éliminer en partie ces inhibiteurs, mais elles entraînent également une perte du matériel génétique ciblé, ce qui a un impact sur la limite de détection des tests. Cet impact est tout de même à relativiser, puisque la PCR en temps réel peut détecter jusqu'à moins de 10 UFC/mL, alors que le seuil de positivité clinique pour une infection, hors septicémies et méningites, est souvent au moins 100 fois plus élevé (quantité minimale de bactéries qui doivent être détectées pour signifier que l'infection est bien due à ce pathogène) (73).

L'avantage de cibler le génome bactérien réside dans le fait qu'il offre **plusieurs degrés de similitude entre les bactéries**. Selon les besoins cliniques, la technique de PCR en temps réel peut être utilisée pour distinguer une cible au niveau de l'**espèce**, d'un **complexe**, d'un **genre**, d'une **famille**, etc... en s'appuyant sur des séquences d'ADN plus ou moins communes. Des gènes très conservés, comme le gène de l'ADNr 16S, permettent une amplification simultanée d'un très large éventail de bactéries, alors que des gènes à

l'origine de voies métaboliques spécifiques permettront une identification à un niveau plus restreint.

En revanche, cibler l'ADN peut également avoir quelques désavantages. Tout d'abord, la fréquence de **mutation des bactéries peut provoquer une fluctuation des performances d'un test**. Il est possible de voir des souches bactériennes présentant une ou plusieurs mutation(s) au niveau de la séquence ciblée par un test de PCR. C'est pourquoi il est important de s'appuyer sur une base de données la plus fournie possible lors de la création du design d'un test de biologie moléculaire, et de réaliser des essais sur un grand nombre de souches différentes lors de la mise au point de ce test. Un autre point important à signaler est qu'il n'y a pas toujours de **corrélation entre la présence d'ADN bactériens dans un tissu ou un prélèvement clinique et la présence de la bactérie vivante**, surtout si des antibiotiques ont été pris récemment par le patient (73). La stabilité de l'ADN est en effet de quelques jours dans le milieu extracellulaire. Dans certains cas, notamment si le test est utilisé pour le suivi d'un traitement antibiotique, il faudra donc cibler préférentiellement l'ARN bactérien, dont la stabilité est de l'ordre de la minute après la mort cellulaire.

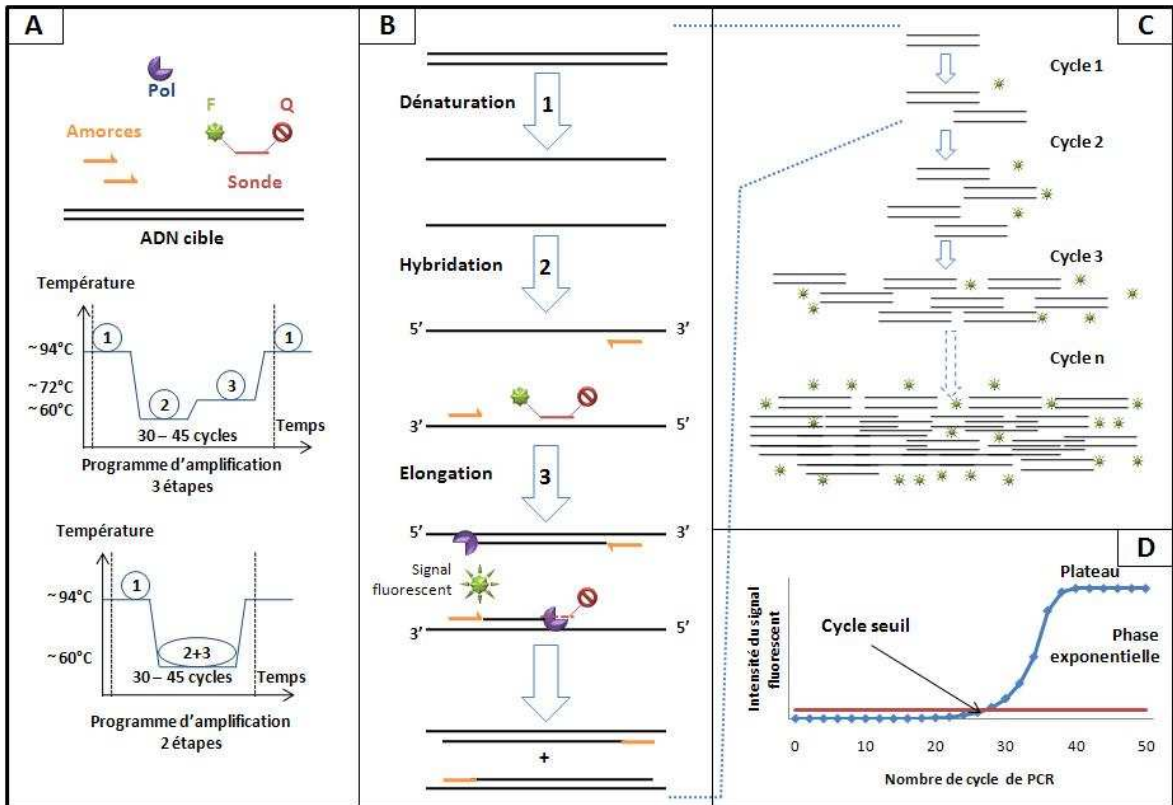
Le **multiplexage**, c'est-à-dire le nombre de cibles détectées au cours d'un test, est également un **facteur limitant de la PCR en temps réel**. Il est possible de rechercher plusieurs cibles simultanément, en mélangeant plusieurs couples d'amorces et de sondes spécifiques afin de pouvoir détecter plusieurs séquences d'ADN distinctement dans une même réaction. L'augmentation du nombre de réactions d'amplifications ayant lieu dans un volume restreint peut toutefois altérer les performances du test. De plus, les instruments de PCR sont limités à six canaux optiques différents pour la lecture de fluorescence en temps réel, donc à six cibles distinctes par réaction. Le format des instruments (barrettes 8 puits, microplaques 96 puits ou 384 puits, etc...) permet de réaliser plusieurs tests en

parallèle sur un même prélèvement, mais cela complexifie la technique, et l'augmentation du temps de manipulation des réactifs et des échantillons se traduit souvent par des **contaminations**. Les coûts et le temps de préparation du test sont également plus importants.

Cette contrainte au niveau du multiplexage a pour conséquence la **limitation des cibles du test aux pathogènes les plus régulièrement isolés dans les prélèvements testés**. La **recherche de résistances aux antibiotiques par PCR en temps réel est également limitée**. Chez les bactéries à Gram positif, quelques marqueurs de résistances sont fréquents et fortement conservés, comme le gène *mecA*, associé à la résistance à la méthicilline chez *S. aureus*, ou les gènes *vanA* et *vanB*, associés à la résistance à la vancomycine chez les Enterococci. Néanmoins, ces **marqueurs ne sont pas spécifiques** de *S. aureus* ou des Enterococci, et peuvent être retrouvés chez d'autres bactéries pathogènes ou commensales. L'identification de SARM ou de VRE par la détection de ces marqueurs est donc quelque peu biaisée (35). Pour les bactéries à Gram négatif, il existe une **très grande diversité génétique des marqueurs de résistances**. Par exemple, pour la famille des *Enterobacteriaceae*, il existe plus de 200 types de BLSE génétiquement distinctes. De plus, la détection d'un marqueur de résistance n'est pas toujours corrélée à un phénotype de résistance à cause de l'**expression différentielle des gènes**. En effet, un gène peut être présent dans l'ADN de la bactérie sans pour autant être exprimé et traduit en quantité suffisante pour que la bactérie soit résistante à l'antibiotique ciblé. La technique de PCR en temps réel est donc **limitée pour la détection de profils de résistances bactériennes à quelques marqueurs spécifiques** (35).

C'est pourquoi cette technique ne remplace pas la culture, nécessaire autant pour l'identification des bactéries les plus rares que pour réaliser un antibiogramme sur un large panel d'antibiotiques.

Figure 11 : Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®)



Notes : Pol = Polymérase, F = Fluorophore, Q = Quencher

**A- (haut)** La technique décrite ici repose sur l'utilisation de sonde TaqMan®, qui porte à son extrémité 5' un fluorophore, et à son extrémité 3' un quencher. Le quencher absorbe la fluorescence du fluorophore, et aucun signal n'est émis. **A- (Milieu et bas)** Programmes d'amplification : 1 = dénaturation, 2 = hybridation, 3 = élongation. Les étapes d'hybridation et d'élongation peuvent être réalisées à la même température (2 étapes), ce qui permet de réduire considérablement le temps de la PCR en temps réel. **B-** Lors de la dénaturation (1), les deux brins d'ADN sont séparés, puis les amorces se fixent sur leur séquence cible au cours de l'hybridation (2). Pendant l'élongation (3) la polymérase, qui possède une activité 5'-exonucléase, va cliver la sonde TaqMan®. Le fluorophore va donc s'éloigner du quencher, qui n'absorbera plus la fluorescence émise par le premier, et un signal pourra être détecté. **C-** Schéma de l'amplification par PCR, corrélée à un nombre de fluorophore clivés (donc émettant un signal fluorescent) augmentant exponentiellement. **D-** Courbe de PCR en temps réel retraçant l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycle PCR. Au début, le signal fluorescent émis ne se démarque pas du bruit de fond. Une phase exponentielle d'amplification du signal apparaît ensuite jusqu'à une phase plateau, correspondant au signal maximal détectable lorsque toutes les sondes TaqMan® ont été clivées. Le cycle seuil correspond au nombre de cycle de PCR qui doivent avoir lieu avant le début de la phase exponentielle. C'est la valeur de ce cycle seuil qui est utilisé pour la quantification d'une cible par rapport à un contrôle de concentration initiale connue.

### **2.2.1.3. Gestion des flux d'échantillons**

La PCR est une réaction qui produit une grande quantité d'amplicons (ADN amplifié). Hors, c'est une technique très sensible. Afin d'éviter les contaminations, **les locaux et les flux doivent être aménagés de façon à éviter de mettre les échantillons et les réactifs en contact avec les produits amplifiés.** Il faut ainsi créer quatre zones séparées physiquement : une zone de préparation des échantillons (extraction d'acides nucléiques), une zone de préparation des réactifs de PCR, une zone où l'ADN à tester est ajouté aux réactifs, et enfin une zone où la PCR est réalisée (22). Le personnel doit également être formé à des conditions et des **procédures de travail strictes et à l'utilisation de méthodes aseptiques.** Toutes ces contraintes restreignent grandement l'utilisation de technique de PCR en temps réel dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique.

Une fois l'infrastructure mise en place, les flux d'échantillons doivent être optimisés. La plupart des instruments de **PCR en temps réel ont un rendement maximal lorsqu'ils sont utilisés pour plusieurs échantillons en même temps.** Selon la taille et le débit des laboratoires de microbiologie, les tests seront ainsi réalisés une ou plusieurs fois par jour. Les tests de PCR en temps réel perdent donc largement leur avantage de rapidité lorsqu'un prélèvement n'est testé que plusieurs heures après son arrivé au sein du laboratoire.

En revanche, la technique étant **entièrement automatisable,** les délais peuvent être **intéressants dans les laboratoires avec un fort débit,** et les temps de manipulation des échantillons peuvent être grandement réduits.

### **2.2.1.4. Tests intégrés de PCR en temps réel.**

Ce terme désigne les formats les plus récents des tests basés sur la PCR en temps réel. On les dit intégrés car **tout le processus du test se déroule au sein d'une unique cartouche, depuis l'extraction jusqu'à la détection** (45). Ces tests permettent la réalisation des

techniques de PCR en temps réel, ainsi que d'autres tests de biologie moléculaire, en un **temps très court** (deux heures au maximum), en **limitant les manipulations** au strict minimum. L'échantillon clinique est déposé dans la cartouche, puis celle-ci est chargée dans un automate. Le programme adéquat est lancé, puis l'extraction, l'amplification et la détection des acides nucléiques ont lieu. Les systèmes étant entièrement fermés, le **risque de contamination est faible**. Les cartouches étant utilisées pour **chaque prélèvement individuellement**, il n'est pas nécessaire d'attendre un nombre suffisant d'échantillons pour lancer l'analyse.

L'amplification se déroulant dans un système scellé, il n'est pas requis de disposer d'infrastructures séparées physiquement pour l'utilisation des tests intégrés. Les instruments eux-mêmes ne requièrent pas beaucoup de place, et peuvent **facilement être installés dans les plus petits laboratoires**.

Enfin, étant donné la nature et la simplicité des manipulations nécessaires à la mise en route du test, celles-ci peuvent être faites à tous moments, y compris en période de garde, où le personnel présent au laboratoire est en nombre restreint.

Le développement de ces systèmes intégrés permet une **démocratisation de l'utilisation en routine de la PCR en temps réel** vers tous les laboratoires de microbiologie clinique, alors que cette technique était jusque là plutôt réservée aux laboratoires ayant les plus forts débits. Les limites au niveau des performances de ces tests restent toutefois les mêmes que vu précédemment.

#### **2.2.1.5. Coûts**

Les tests de PCR en temps réel ont des coûts plus importants que les méthodes conventionnelles principalement à cause du coût élevé des réactifs. En revanche, la rapidité d'obtention des résultats peut compenser ces coûts, puisque cela permet de mettre en place

une antibiothérapie adaptée plus tôt. Le nombre d'analyses complémentaires à réaliser peut également être réduit, ce qui limite encore les coûts hospitaliers globaux.

Les systèmes intégrés, s'ils pallient aux problèmes de flux d'échantillons et d'accessibilité à la technique de PCR en temps réel, sont en revanche plus chers.

## 2.2.2. Tests basés sur la technique de FISH

### 2.2.2.1. *Technique utilisant des sondes PNA (PNA-FISH)*

Les PNA sont des molécules proches de l'ADN ou de l'ARN. Elles contiennent des bases similaires à celles de l'ADN, mais celles-ci sont reliées entre elles par des liaisons polyamides (squelette peptidique), contrairement aux ADN et ARN dont le squelette est composé de liaisons ribose-phosphate. Les PNA sont entièrement synthétiques, elles n'existent pas à l'état naturel, ou n'ont pas encore été découvertes, selon le point de vu.

Le squelette ribose-phosphate de l'ADN ou de l'ARN est chargé négativement. Ces charges fragilisent l'hybridation de deux brins d'ADN ou d'ARN. Le squelette des PNA n'est quant à lui pas chargé, ce qui permet d'obtenir une **hybridation PNA-ADN ou PNA-ARN plus stable**.

La technique de PNA-FISH cible les **ARN ribosomaux** des bactéries. Ceux-ci sont présents en **grande quantité** (plus de 80% des ARN totaux d'une cellule) et contiennent des **régions très conservées, spécifiques d'espèces**, ce qui en fait une cible intéressante pour la technique de FISH. En revanche, ils sont rassemblés en **structures très compactes**, ce qui limite l'utilisation de sonde ADN, manquant d'affinité pour se lier au sein de ces structures. C'est pourquoi les **PNA sont utilisés comme sondes de haute affinité**, afin de former un complexe plus stable avec ces ARNr.

La société AdvanDx commercialise depuis 2003 des kits de diagnostic, basés sur la technique de PNA-FISH, pour la détection de bactéries **à partir d'hémocultures positives**. Un test de Gram doit être fait au préalable, afin de définir le kit de PNA-FISH à utiliser. Actuellement, le menu de bactéries détectées à partir d'hémoculture est assez limité. Six kits certifiés IVD existent pour identifier :

- *E. coli* et *P. aeruginosa*
- *E. coli* et/ou *K. pneumoniae* (pas de distinction) et *P. aeruginosa*
- *E. coli* et *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* (distinction des 3 espèces)
- *S. aureus*
- *S. aureus* et les Staphylococci coagulase négatif
- *E. faecalis* et les autres Enterococci.

Les trois premiers kits sont à utiliser lorsque l'examen direct met en évidence des **bacilles à Gram négatif**, les trois derniers pour l'identification de **cocci à Gram positif**. Une sonde pour la détection d'*Acinetobacter* spp a été décrite (47), mais n'est actuellement utilisable qu'en recherche. Des études ont également démontré que les PNA-FISH pouvaient être utilisées directement sur d'**autres types de prélèvements**, comme les expectorations pulmonaires (37), les lavages broncho-alvéolaires (LBA) (71), les biopsies de plaies (8), les biopsies gastriques (12) ou encore les urines (72).

La technique est **très simple d'utilisation** : les sondes PNA-FISH sélectionnées après l'examen direct sont ajoutées à une goutte d'hémoculture positive, après fixation de celle-ci sur une lame de microscope. Après une période d'incubation de 90 minutes dans un bain-marie pour l'hybridation des sondes, la lame est lavée puis analysée avec un microscope disposant d'une lampe à ultra-violet (UV) pour la recherche des bactéries marquées. Le **temps total d'analyse par cette technique est de 2h30 environ**, à partir du



dépôt de l'échantillon de sang sur une lame de microscope jusqu'à la lecture de celle-ci par fluorescence. **Le temps de manipulation est de 45 minutes environ** par série (25).

#### **2.2.2.2. Technique utilisant des sondes "en épingle à cheveux"**

La société miacom diagnostics commercialise également des tests basés sur la technique de FISH, ciblant toujours les **ARNr**, pour l'identification de bactéries directement à partir de **prélèvements cliniques ou d'hémocultures positives**.

Les sondes utilisées ici sont des sondes "en épingle à cheveux". Ce sont des oligonucléotides (ADN) avec un fluorophore à une extrémité et un quencher à l'autre. La séquence centrale est spécifique de l'ARNr cible, alors que les séquences des deux extrémités sont complémentaires l'une de l'autre, permettant ainsi un repliement de la sonde en forme d'épingle à cheveux. La séquence spécifique forme la boucle et le fluorophore et le quencher se côtoient à l'extrémité en forme de tige. Il n'y a donc pas de signal fluorescent lorsque la sonde est dans cette configuration. Lorsque la sonde est dénaturée, la séquence spécifique est accessible pour se fixer sur la cible. Cette hybridation éloigne le fluorophore du quencher et un signal fluorescent peut donc être détecté.

Le **menu est plus étendu que pour les tests PNA-FISH**, et les kits sont conçus de façon à identifier un panel de bactéries en fonction d'une pathologie. Deux kits sont actuellement certifiés CE-IVD :

- Le **kit "Pneumonies"**, pour les pneumopathies nosocomiales et les PAVM, est utilisable directement à partir de prélèvements pulmonaires. Seul un panel de bactéries Gram négatif est validé pour le diagnostic (détection des *Enterobacteriaceae* au niveau de la famille ou de l'espèce pour certains pathogènes, de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*,

*Moraxella catarrhalis* et *H. influenza*). Un panel de bactéries Gram positif est disponible pour une utilisation en recherche uniquement.

- Le kit “**Septicémies**” est utilisable à partir d’hémocultures positives. Trois panels différents sont certifiés CE-IVD :
  - un panel de bactéries Gram négatif, proche du panel “Pneumonies”, avec en plus la détection du genre *Salmonella* et moins de bactéries de la famille *Enterobacteriaceae* identifiées au niveau de l’espèce ;
  - un panel de bactéries Gram positif pour l’identification du genre *Staphylococcus* et de *S. aureus*, du genre *Streptococcus* et de trois espèces de ce genre (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes* et *S. agalactiae*), de *Clostridium perfringens*, d’*E. faecalis* et d’*E. faecium* ;
  - un test pour la détection de *S. aureus* uniquement.

Cette technique est **plus rapide que celle de PNA-FISH**. En effet, les étapes d’incubation des sondes avec les bactéries et de lavage sont beaucoup plus courtes (respectivement 11 minutes et 1 minute contre 90 minutes et 45 minutes pour la technique de PNA-FISH). Le temps de manipulation total est de 10 minutes, et le **temps total d’analyse est d’environ 30 minutes**.

### 2.2.2.3. Performances des techniques de FISH

#### PNA-FISH

Les sondes PNA-FISH ont une **sensibilité et une spécificité supérieure à 98% dans l’ensemble**. La sonde ciblant *P. aeruginosa* montre une sensibilité (52) et une spécificité (47) légèrement inférieures, selon les études (respectivement 94,1% et 95%). La limite de détection de cette méthode est la même que celle de l’examen direct, soit **10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> UFC/mL** selon les prélèvements.

L'avantage majeur de cette technique est la **rapidité de l'identification**, avec un résultat de l'analyse obtenu en 2h30 à partir d'hémocultures positives. Cette technique ayant le potentiel d'être **réalisée directement sur d'autres types d'échantillons cliniques**, une identification pourrait être obtenue le jour même du prélèvement dans le cas d'échantillons urinaires ou de LBA, par exemple.

Le cas de la **détection des SCN** en particulier montre bien tout l'impact que peuvent avoir ces tests. Lorsque des SCN sont détectés dans une hémoculture positive, il est estimé qu'il s'agit d'une contamination pour 80% des échantillons et que la majorité des cas d'infections à SCN sont dus à l'utilisation de dispositifs intra-vasculaires (42). L'examen direct des hémocultures positives ne permet pas de différencier *S. aureus* des SCN, et la culture de ces derniers dure deux à trois jours. Une contamination du prélèvement peut cacher le véritable pathogène responsable de l'infection, et un traitement non nécessaire ou inadapté est administré pendant plusieurs jours. Avec les sondes PNA-FISH, les SCN sont détectés 2h30 après que l'hémoculture devienne positive, ce qui permet d'avertir le clinicien très précocement, en général, afin qu'un nouvel échantillon soit prélevé.

La culture des bactéries est tout de même nécessaire pour réaliser un antibiogramme. En effet, la cible des PNA-FISH étant les ARN ribosomiaux, cette technique est **utilisable pour l'identification de pathogènes principalement**. La détection de résistances est possible dans un seul cas, lorsqu'une mutation au niveau chromosomique des gènes codant pour les ARNr confère une résistance aux macrolides, lincosanides et streptogramines. Si la résistance à cette classe d'antibiotiques est de plus en plus fréquente, ce mécanisme de résistance en particulier n'a été décrit que récemment, chez quelques espèces comme *Mycobacterium avium* ou *Helicobacter pylori*, qui ne sont pas des pathogènes responsables d'IN.

### *FISH avec des sondes “en épingle à cheveux”*

Cette technique étant relativement récente (première présentation en 2008), les publications qui la comparent aux méthodes conventionnelles d'identification de pathogènes sont rares. Les données disponibles proviennent du site internet du fabricant, miacom diagnostics (68), ou de posters présentés lors de congrès en 2010 ou en 2011.

Pour le kit “Pneumonies”, **la sensibilité est de 97% et la spécificité est de 93%**, selon le fabricant. La sensibilité semble tout de même variable selon les pathogènes ciblés. La spécificité globale du test, par rapport aux techniques conventionnelles, a été évaluée à 84,5% seulement, variant de 20% pour la détection de *K. pneumoniae* à 100% pour *Serratia marcescens*, *Proteus spp* et *P. aeruginosa* (69). Toutefois, le faible nombre d'isolats testés dans cette étude limite la portée de ces résultats (303 isolats, dont 155 positifs). Pour le kit “Septicémie”, **la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 95% et 98%** (98% et 99% pour le test ciblant *S. aureus* uniquement) (68). Ces résultats ont été ‘confirmés’ par une étude réalisée à partir de 152 hémocultures positives (70).

L'avantage principal de cette technique, comme pour celle de PNA-FISH, est la **rapidité** et la **simplicité** de l'identification, pour des **performances similaires aux méthodes conventionnelles**. Pour l'instant, les kits sont validés pour une utilisation à partir d'hémocultures positives ou de prélèvements pulmonaires (LBA et expectorations), mais d'autres types de prélèvements pourraient être inclus dans cette liste, comme les prélèvements urinaires et les frottis de plaies. Comme pour la technique de PNA-FISH, les cibles étant les ARNr, l'utilisation de cette technique est pour l'instant **réservée à l'identification de pathogènes**, pour les IN. La limite de détection est la même que celle de l'examen direct ou des PNA-FISH, soit  $10^4$  à  $10^5$  UFC/mL

#### 2.2.2.4. *Gestion des flux d'échantillons et locaux requis*

L'utilisation de test basé sur la technique de FISH n'**ajoute que peu de contrainte à la routine du laboratoire**, la complexité de ces tests étant similaire à celle de l'examen direct. Ils sont rapides, avec un court temps de manipulation requis pour les réaliser, 10 à 45 minutes par série, et peuvent **facilement être intégrés au processus de l'examen direct**. Le matériel nécessaire pour ces tests est relativement simple : un bain-marie ou une plaque chauffante pour l'hybridation des sondes, un jeu de pipettes de paille et un microscope UV pour la lecture des lames. L'espace requis pour leur réalisation est faible.

#### 2.2.2.5. *Coûts*

Les coûts de ces techniques de FISH sont plus élevés que ceux des méthodes d'identification conventionnelles. Le coût d'un test est du même ordre de grandeur que ceux de la PCR en temps réel pour les PNA-FISH, légèrement inférieure pour la technique basée sur l'utilisation de sonde "en épingle à cheveux". L'investissement pour les équipements est nettement inférieur, en revanche. Comme pour la PCR en temps réel, une identification rapide permet de réduire les coûts hospitaliers globaux. Une étude interventionnelle sur l'utilisation des kits PNA-FISH pour identifier les SCN et *S. aureus* estime la réduction de ces coûts d'environ US\$ 4 000 par patient testé (25). Cela concerne les patients hospitalisés en dehors des USI. Pour les patients présents dans les USI, la réduction des coûts d'hospitalisation n'était pas significative dans cette étude (cela étant dû au faible nombre de ces patients inclus et à la sévérité de leur pathologie, d'après l'auteur).

## 2.2.3. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

### 2.2.3.1. Introduction sur la spectrométrie de masse

La première utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification de bactéries date de 1975 (2). Cette identification était tout de même très limitée, puisqu'à l'époque la technique permettait seulement la détection de molécules avec un poids moléculaire inférieur à 1500 Da. La technologie MALDI-TOF a permis, dès 1996, l'identification de protéines membranaires (32). En revanche, ces cibles montraient une trop forte variation intra-espèces et des différences selon les conditions de cultures. Il fallut attendre 2006 pour voir le **développement de nouvelles matrices permettant l'exposition des protéines intracellulaires** à l'analyse par spectrométrie de masse (53). Ces protéines, **principalement ribosomales**, sont très conservées au sein d'une même espèce tout en permettant une bonne discrimination inter-espèces ou inter-genres. Aujourd'hui, ces avancées font de la spectrométrie de masse une technologie très **propice à l'identification en routine des bactéries**, au sein des laboratoires de microbiologie clinique (20).

Les spectromètres de masse sont composés de trois éléments :

- une **source d'ions**, qui ionise et fractionne les cibles à analyser
- un **séparateur d'ions**, qui permet de discriminer ces analytes selon le rapport de leur masse sur leur charge électrique (rapport m/z)
- un **détecteur**

### 2.2.3.2. Description de la technique MALDI-TOF

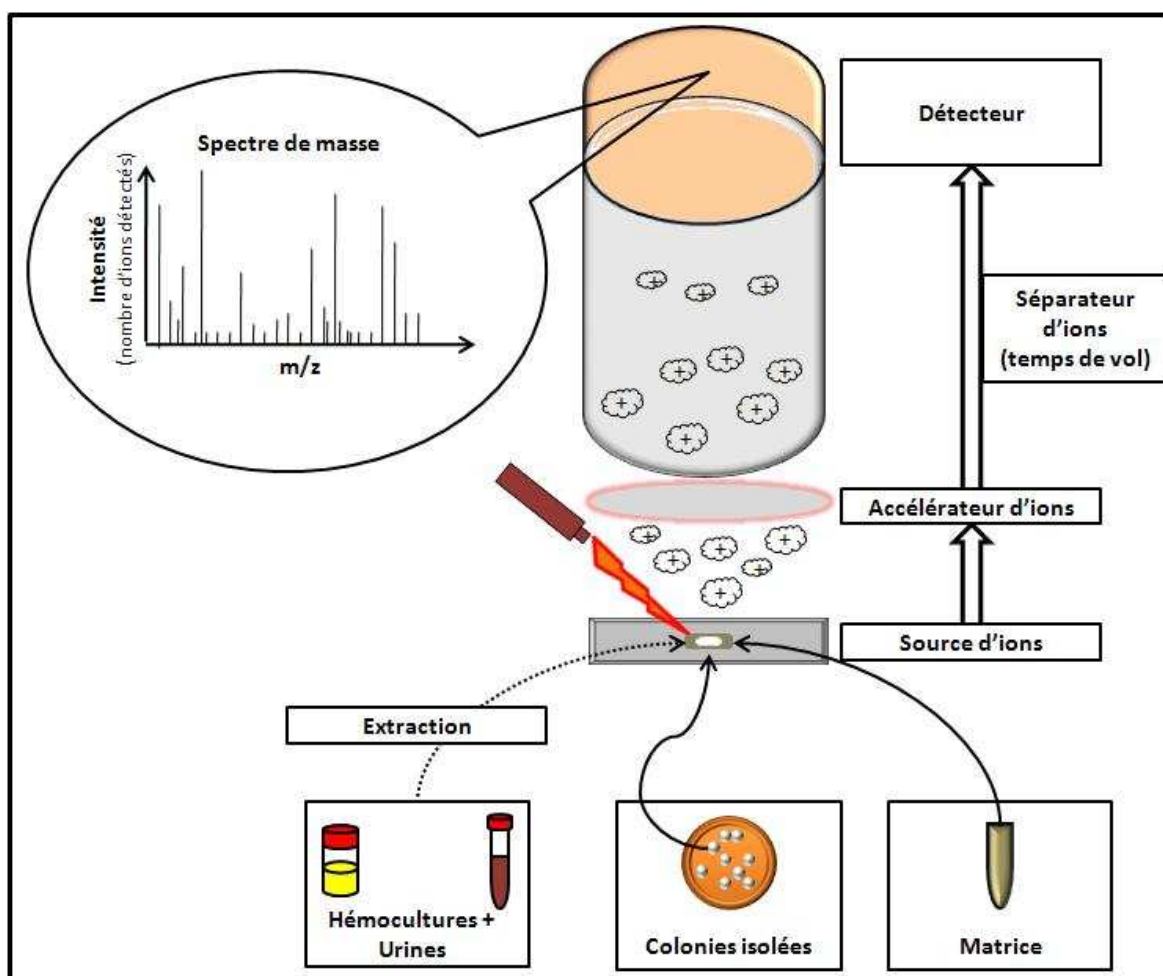
Pour l'identification de bactéries par MALDI-TOF, les cibles sont principalement des **protéines ribosomales**, puisque celles-ci sont présentes en quantités largement supérieures aux autres. Les analytes sont des peptides issus du fractionnement de ces protéines ribosomales (figure 12). Le spectre de masse obtenu est comparé avec une **base de**

**données**, et une correspondance plus ou moins proche avec les profils existant est établie, selon le nombre de pics, leur intensité et la valeur du rapport m/z. **L'identification peut être faite au niveau de l'espèce ou du genre bactérien.** Un **score de similarité** permet à l'utilisateur de valider cette correspondance. Si aucune correspondance stricte n'est retrouvée, un **arbre phylogénétique** est tracé afin d'estimer la proximité de la souche testée par rapport aux espèces présentes dans la base de données.

Deux instruments de spectrométrie de masse MALDI-TOF sont commercialisés actuellement pour l'identification bactérienne en routine : le **MALDI Biotyper** (Bruker Daltonics) et le **Vitek MS** (Shimadzu / bioMérieux). Bien que la technologie de spectrométrie de masse utilisée soit la même, ces deux instruments se distinguent au niveau du **traitement du spectre de masse généré** (20). Pour le MALDI Biotyper, le logiciel d'analyse **compare un grand nombre de pics** avec la base de données (au maximum une centaine) pour chercher les spectres qui correspondent le mieux. Un score est établi selon trois critères (11):

- la correspondance du spectre à identifier avec le spectre de la base de données,
- la correspondance des pics du spectre de la base de données avec ceux du spectre à identifier,
- finalement la corrélation des intensités des pics similaires.

Figure 12 : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF



**Légende :** la cible est déposée sur une plaque métallique avec une matrice. Cette cible est une colonie isolée dans la majorité des cas, mais l'analyse peut être réalisée sur des hémocultures positives ou des prélèvements urinaires, après extraction des bactéries présentes dans ces échantillons. La matrice cristallise autour de la cible, puis est irradiée par un laser. Cette énergie permet le fractionnement de la cible en analytes au cours de la désorption des molécules, ainsi que le transfert de protons depuis la matrice vers ces analytes, qui sont dès lors ionisés. Les analytes sont ensuite acheminés, via un champ électrique qui accélère les ions, dans une colonne sous vide où ils sont séparés : les molécules avec les masses les plus faibles 'volent' à travers cette colonne plus rapidement que les molécules plus lourdes. Un détecteur mesure en continu le temps de parcours de chaque analyte. Un spectre de masse est ainsi tracé. Celui-ci représente l'intensité, c'est-à-dire le nombre d'analytes détectés à un temps donné, en fonction du temps de vol, qui correspond au rapport masse sur charge  $m/z$ .

Pour le Vitek MS, le logiciel se concentre sur l'analyse d'une **quinzaine de pics** seulement, ceux-ci étant **partagés par un faible nombre d'espèces**. Ces spectres réduits sont appelés **super-spectres** (20). Le spectre à analyser est comparé à la base de données



de super-spectres, et un score de correspondance est calculé au niveau de la famille, du genre ou de l'espèce pour la cible à identifier.

### **2.2.3.3. Performances de la technique MALDI-TOF**

Comme pour les techniques d'identification conventionnelles, les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF doivent être réalisées sur un échantillon monobactérien. C'est pourquoi cette technique est utilisée dans la presque totalité des cas à partir de **colonies isolées**. Des protocoles d'extraction ont été décrits pour une analyse directement à partir de **prélèvements urinaires** (23) ou d'**hémocultures positives** (24,48). Dans ces cas, les prélèvements doivent contenir plus de **10<sup>5</sup> UFC/mL** pour une bonne identification (20,23).

De nombreuses études ont été menées pour comparer l'identification de bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF, à partir de cultures isolées, avec les méthodes d'identification conventionnelles (49,50,51), avec l'identification par séquençage de l'ADNr 16S (7,11,43) et avec la PCR (55). Quelque soit le spectromètre de masse utilisé, les **taux d'identification par rapport à ces techniques étaient proches de 100%, voire supérieures à 100%**. Dans quelques cas, les scores d'identification obtenus à partir de l'analyse sur colonies isolées étaient en-dessous du seuil acceptable. Une **étape d'extraction** était nécessaire pour les identifier correctement dans un second temps (jusqu'à 25% des prélèvements nécessitaient une extraction pour être identifiés (6)).

Le point fort principal de cette technique est qu'elle permet une **analyse extrêmement rapide** : un résultat est disponible en **1 à 2 minutes par échantillon** lorsque l'analyse est réalisée directement à partir de colonies isolées, et le **temps de manipulation est très bref**. Une **extraction de ces colonies peut être nécessaire**, ce qui allonge ce temps à 6 minutes par échantillon. A partir d'urines ou d'hémocultures positives, une extraction plus

longue est nécessaire, durant entre 30 et 60 minutes par échantillon. L'analyse est plus efficace quand ces étapes d'extractions sont réalisées pour une série de prélèvements. Pour les analyses urgentes, le temps de manipulation est tout de même relativement faible, ce qui permet de procéder à l'extraction des colonies ou des prélèvements individuellement afin de ne pas augmenter le délai d'obtention du résultat.

Un autre avantage réside dans l'analyse des résultats à travers une **base de données qui est complétée continuellement**. Ainsi, la quantité d'espèces différentes pouvant être détectées augmente sans cesse sans complexifier la technique, et même les **bactéries les plus rarement isolées** dans les laboratoires de microbiologie clinique peuvent être détectées facilement et rapidement. Les résultats, étant rendus sous forme de score d'identification et/ou d'arbre phylogénétique, permettent aux biologistes un contrôle et une validation des identifications.

La **recherche de marqueurs protéiques de résistances aux antibiotiques** est également possible avec cette technique. Les protéines doivent être en **quantité suffisante** pour qu'une modification au niveau du spectre de masse soit détectable. L'analyse d'un grand nombre de spectres de masse pourrait permettre d'**identifier plusieurs profils associés à des résistances** aux antibiotiques. Par exemple, la détection d'un type de bêta-lactamase par la recherche d'un pic spécifique a été décrite (9). Il est toutefois à noter que l'**activité des antibiotiques testés *in vitro* n'est pas toujours corrélée à l'activité *in vivo***, ce biais étant retrouvé également dans la technique de référence, l'antibiogramme. Le pathogène devant être testé devrait également être **incubé en présence de l'antibiotique** pendant quelques heures avant l'analyse, afin de détecter les résistances dont l'expression est transitoire (antibiotique-dépendante).

#### 2.2.3.4. Gestion des flux d'échantillons

Le **temps de manipulation des échantillons est très court**, plus court même que pour les méthodes phénotypiques conventionnelles automatisées, pour les tests à partir de colonies isolées. L'analyse elle-même est également rapide, ce qui permet d'utiliser cette technique à un **très haut débit**. Un examen direct et une extraction des bactéries devant être réalisés sur les autres types de prélèvement, le temps de manipulation et donc l'analyse sont plus longs. Il n'est **pas nécessaire d'attendre un nombre minimum d'échantillons** pour atteindre la pleine efficacité de la méthode, contrairement à la PCR en temps réel.

#### 2.2.3.5. Coûts

En plus d'être une des techniques les plus rapides, la spectrométrie de masse est également parmi les moins chères. Si l'investissement initial, l'achat d'un spectromètre de masse, est considérable, le prix du test en lui-même est très faible. Dans une étude, le coût d'un test a été évalué en moyenne à 1,43€, soit 22% à 32% du coût des tests conventionnels (51). Dans une autre publication, le test coûte US\$ 0,50, soit deux fois et demi plus cher que les tests pour l'identification d'*E. coli*, mais trois fois moins cher que ceux pour *S. aureus*, et plus de 20 fois moins cher que les tests pour l'identification du reste des bactéries (11). Il faut également prendre en compte les surcoûts hospitaliers globaux évités par l'identification rapide des pathogènes.

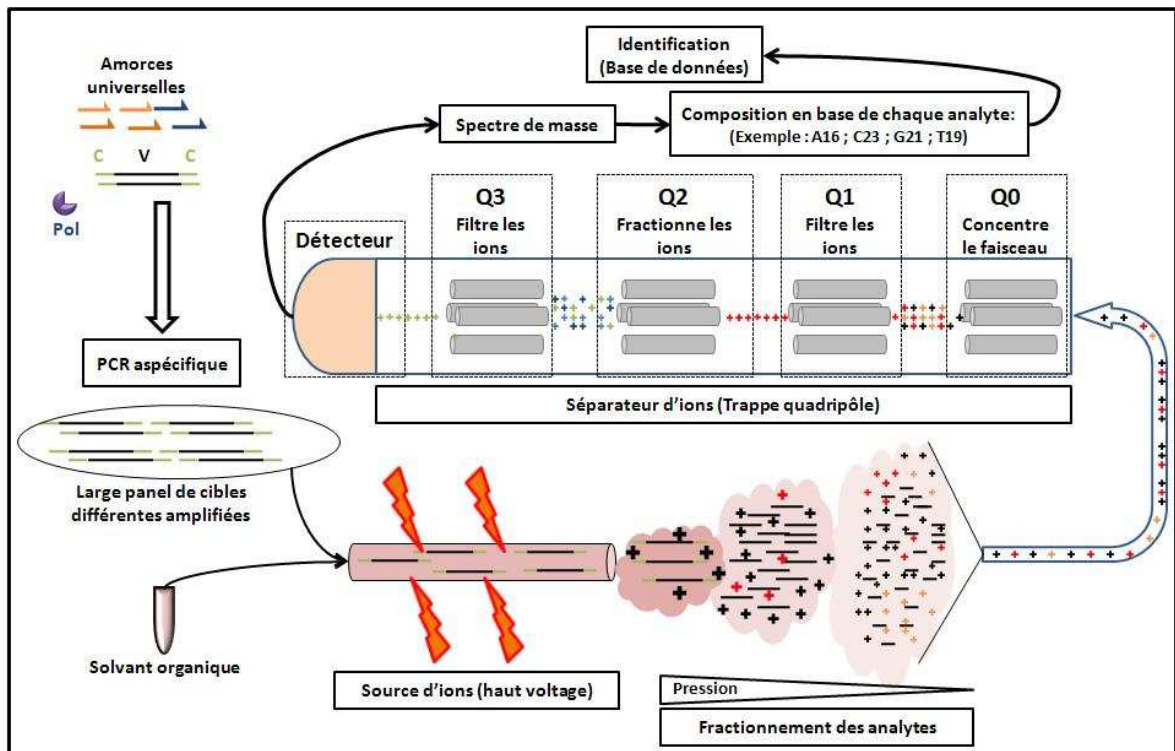
### 2.2.4. PCR – ESI

#### 2.2.4.1. Description de la technique de PCR - ESI

Cette technique repose sur l'**identification de séquences d'ADN par spectrométrie de masse ESI** (figure 13). Une étape de PCR permet d'amplifier un **large éventail de cibles**, principalement des gènes codants pour l'ADNr 16S et l'ADNr 23S. Ces ADN sont composés à la fois de séquences très conservées, permettant l'utilisation d'amorces

universelles pour l'amplification de l'ADN d'un très large panel de bactéries, et de séquences spécifiques à chaque espèce. Des gènes de ménage conservés et des séquences plus spécifiques de certains marqueurs de résistances peuvent également être amplifiés. Toutes ces séquences d'ADN ainsi générées sont ensuite analysées par spectrométrie de masse, et les **empreintes génétiques obtenues sont comparées à une base de données** pour l'identification des cibles présentes dans l'échantillon.

**Figure 13 : Principe de la technique de PCR-ESI**



**Notes :** Pol = Polymérase, C = parties conservées de la cible ADN, V = partie variable de la cible ADN, Q : Quadripôle.

**Légende :** La technique de spectrométrie de masse utilisée est la technique ESI – Q-Trap. La cible, de l'ADN dans ce cas, est dissoute dans un solvant organique. Cette solution est ensuite transférée dans un capillaire, où un haut voltage est appliqué à l'échantillon. Cette source ESI permet ainsi la nébulisation de l'échantillon en fines gouttelettes chargées électriquement. Ces particules sont ensuite injectées dans un compartiment où la pression diminue rapidement, conduisant à la formation d'une phase gazeuse dans laquelle les analytes sont fragmentés et dispersés sous forme ionisée. Ils sont majoritairement poly-chargés, c'est-à-dire que chaque analyte, un fragment d'ADN, possède plusieurs charges électriques. Les analytes sont ensuite acheminés vers le module de séparation d'ions Q-Trap. Ce système se compose de quatre quadripôles traversés successivement par les analytes, avant leur arrivée au niveau du détecteur. Un spectre de masse est généré, permettant la définition de la composition en base de chaque fragment d'ADN détecté. La comparaison de ces séquences avec une base de données permet d'identifier la ou les pathogènes.

Ce système, plus complexe que la technique MALDI-TOF, autorise la **sélection des analytes** que l'on souhaite détecter. Cela permet donc de réduire le bruit de fond et d'augmenter la **sensibilité** pour la détection d'analytes ciblés faiblement concentrés. La **résolution** est également très nettement améliorée, ce qui permet de définir la **composition en base** des séquences d'ADN (18,20). Le résultat final est rendu sous forme de **score d'identification** et d'un **arbre phylogénétique**, comme pour la technique MALDI-TOF.

Une société commercialise actuellement un instrument **automatisant entièrement la technique de PCR-ESI**, depuis l'extraction des acides nucléiques jusqu'à l'analyse des spectres de masse et l'identification de pathogènes. Cet instrument, l'**Abbott PLEX-ID** (Abbott), permet d'obtenir une identification en **4 à 6 heures**, directement à partir de **prélèvements cliniques**.

#### **2.2.4.2. Performances de la technique PCR-ESI**

L'avantage de cette technique est qu'elle permet une **identification rapide** directement à partir de prélèvements cliniques, même **polybactériens** (18). Elle permet un **multiplexage à haut débit**, en combinant les avantages de la **sensibilité** et de la **reproductibilité** de la PCR avec la **rapidité** de détection et le **panel très large de cibles** pouvant être identifiée par la spectrométrie de masse. La limite de la spectrométrie de masse au niveau de la détection de bactéries difficilement cultivables est largement palliée par l'utilisation de la PCR. La limitation du multiplexage pour la PCR en temps réel, et par conséquent l'abandon de cette technique pour la détection des bactéries les moins fréquemment isolées, est également levée grâce à la détection des produits d'amplification par la spectrométrie de masse. La **synergie qu'il y a entre ces deux technologies est très importante**, et une utilisation de la PCR-ESI pour l'**identification en routine** des bactéries semble très prometteuse.

L'étape d'**extraction des acides nucléiques** reste l'étape limitante pour cette technique, et il est primordial que les **inhibiteurs de PCR** soient bien éliminés. Les **contaminations** constituent également un grand risque pour la PCR-ESI, puisque la technique **détecte de façon très sensible un très large panel de bactéries**. Les réactifs et consommables doivent être purs de tout ADN contaminants. Les ADN polymérases, notamment, qui sont principalement produites par des techniques de biologie recombinante chez *E. coli*, et sont souvent contaminées par l'ADN de cette bactérie dans les kits. Une **démarche qualité** doit permettre d'évaluer les risques de contamination des réactifs et des consommables. La PCR étant réalisée au sein de l'automate, en système clos, les contaminations à ce niveau là sont évitées.

Les performances de la PCR-ESI pour l'identification de bactéries montrent une très bonne corrélation avec les méthodes conventionnelles : 98,7% d'identification pour la PCR-ESI à partir d'hémocultures positives (36). La technique est capable de **différencier des mélanges de bactéries**, même lorsque ces bactéries sont du même genre. La PCR-ESI peut être rendue **semi-quantitative** par l'ajout d'un contrôle interne de concentration connue (20). Ce contrôle doit avoir la même séquence que la cible au niveau des zones de reconnaissance des amorces, mais le produit d'amplification doit être suffisamment différent pour être distingué. La technique est également utilisable pour la **recherche de marqueurs de résistances**. Des **amorces spécifiques** peuvent être ajoutées lors de l'étape de PCR, afin de détecter des marqueurs tels que *mecA*, *vanA* et *vanB* (17,18,20). L'utilisation de la PCR-ESI a déjà été décrite, avec des performances comparables au séquençage ou à l'antibiogramme, sur des marqueurs de résistances aux quinolones, *gyrA*, *parC*, chez *A. baumannii*, et sur le marqueur *bla<sub>KPC</sub>* codant pour une carbapénémase, chez *K. pneumoniae* (21).

#### 2.2.4.3. Gestion des flux d'échantillons

La technique est **presque entièrement automatisée**. Une manipulation de l'échantillon est nécessaire pour déposer les prélèvements dans les plaques 96 puits, avant de charger ces plaques dans l'instrument. L'étape de manipulation de l'échantillon doit être réalisée dans des locaux séparés physiquement de l'instrument, mais les **contraintes sont moins importantes que pour la PCR en temps réel**, qui nécessite quatre zones différentes et une gestion des flux plus stricte.

La technique permet les **analyses à très haut débit** et est donc plus adaptée pour les importants laboratoires de microbiologie cliniques, au même titre que la PCR en temps réel. Jusqu'à 30 plaques de 96 puits peuvent être analysées en 24h, soit 2880 prélèvements par jour, avec des résultats disponibles en 4 à 6 heures. Le rendement est plus important lorsque la PCR-ESI est utilisée sur des séries d'échantillons. **La rapidité d'analyse peut varier selon le temps nécessaire à l'attente d'un nombre suffisant de prélèvements à tester.**

#### 2.2.4.4. Coûts

La technique des PCR-ESI coûte plus cher que les tests d'identification phénotypique conventionnels et que l'analyse par la technique MALDI-TOF. Les coûts sont comparables à ceux de la PCR en temps réel.

### 3. Discussion

#### *Intérêts et objectifs du suivi épidémiologique des infections nosocomiales*

Le suivi épidémiologique des infections nosocomiales est très important. Il constitue notamment un **critère de qualité des soins**, et permet de mettre en évidence, au niveau d'un hôpital comme au niveau d'un service en particulier, des **facteurs de risques** suspectés ou inattendus de développement d'infections nosocomiales. L'identification de ces facteurs de risques permet la mise en place de **mesures de prévention ciblées**, pour une **prise en charge optimale** des patients concernés. L'exemple de la réduction conséquente de l'incidence des PAVM, lorsque des bains de bouche à la chlorhexidine sont réalisés pour les patients ventilés mécaniquement, illustre parfaitement l'efficacité de cette prévention ciblée. Ce suivi permet également d'**évaluer l'efficacité des méthodes de prévention** mises en place. Plus généralement, il sert de base aux études interventionnelles, que ce soit au niveau de la prévention, du diagnostic ou encore du traitement des infections nosocomiales.

Le suivi épidémiologique permet également une détection plus précoce d'épisodes épidémiques d'infections nosocomiales. Bien que ceux-ci ne soient pas abordés dans cette thèse, il est important de noter que leur détection précoce, ainsi que celle de leur origine, permet de réduire la diffusion de la souche pathogène en cause.

La connaissance de l'épidémiologie des infections nosocomiales a un fort intérêt pour la **définition de protocoles d'antibiothérapie empirique**. Ceux-ci seront choisis en fonction du service concerné, de la catégorie de patients touchés ou bien du type de soins reçus. Le **suivi des taux de résistances** aux antibiotiques est également primordial pour la mise en place de ces protocoles.



Toutefois, cette antibiothérapie empirique, et donc la prise en charge initiale des patients développant une infection nosocomiale, repose uniquement sur des **facteurs prédictifs**. Pour qu'un traitement anti-infectieux ait un impact maximal, il faut qu'il soit établi à partir de **données microbiologiques fiables**, regroupant l'identification du pathogène en cause ainsi que sa sensibilité vis-à-vis des antibiotiques disponibles. Les méthodes conventionnelles, basées sur la culture et la caractérisation biochimique et phénotypique du micro-organisme, sont longues et laborieuses. Or, la prise en charge d'une infection doit être la plus précoce possible pour empêcher le pathogène de se développer au point d'engager le pronostic vital du patient.

### *Test diagnostic idéal*

Les critères pour la sélection d'un test diagnostic idéal peuvent être classés en 3 catégories : la **performance** du test, les **contraintes au niveau du flux et du traitement des échantillons** et le **coût** du test (tableau IV).

- Au niveau des performances, le test idéal serait :
  - **rapide**, avec un résultat obtenu en quelques minutes ou quelques heures après le prélèvement. C'est le facteur le plus important ;
  - **sensible et spécifique**;
  - capable de **détecter une faible quantité de micro-organismes**, afin de diagnostiquer une infection le plus précocement possible ;
  - capable de détecter un **grand nombre de cibles différentes** ;
  - utilisable directement à partir de **tous types de prélèvements**, peu importe le nombre de micro-organismes différents qu'ils contiennent ;
  - capable de détecter aussi bien les **bactéries rarement isolées** que celles ayant des **conditions de culture difficiles** ;

- **quantitative**, afin de distinguer l'agent pathogène de la flore commensale du patient. Ce critère n'est toutefois pas indispensable lorsque l'analyse se fait à partir de prélèvements normalement stériles, comme le sang ou le liquide céphalo-rachidien (LCR), ou bien à partir de colonies isolées.
- Pour l'aspect du flux et du traitement des échantillons, le test devrait :
  - être peu contraignant en termes d'**espace nécessaire à sa réalisation** ;
  - être **facile à réaliser**, ne nécessitant pas de personnel hautement qualifié ;
  - avoir un **temps de manipulation** le plus court possible ;
  - fonctionner de manière optimale aussi bien à bas, moyen et haut débit, afin d'être accessible aux laboratoires de microbiologie clinique de toutes tailles.
- Les coûts de réalisation du test devraient également être le plus bas possible, bien entendu, aussi bien au niveau :
  - de l'**investissement initial** pour la mise en place de la technique ;
  - du coût d'**un test** (coût des réactifs, coût de fonctionnement des appareils) ;
  - du temps et du **personnel** requis.

### *Intérêts et limites des techniques de diagnostic rapide décrites*

Malheureusement, la **technique idéale n'existe pas actuellement**. Parmi les techniques permettant un diagnostic rapide, la technique de **PCR en temps réel** montre des **performances très satisfaisantes**. En revanche, elle est très **contraignante** au niveau de la gestion des flux d'échantillons et de l'espace nécessaire, et requiert un **débit important** pour atteindre un rendement optimal. Le développement des **tests intégrés** de PCR en temps réel peut pallier ce problème, leur utilisation étant simplifiée et l'espace requis grandement réduit. Même si ces tests intégrés devraient permettre, dans les années à venir, une **démocratisation de la PCR en temps réel vers les laboratoires les plus petits**, l'utilisation de ces tests est toutefois limitée, à cause du **multiplexage restreint**.

**Tableau IV : Comparaison des techniques de diagnostic rapide évoquées**

| Techniques  | Biologie moléculaire                         |                             |  |  | Spectrométrie de masse   |   |
|---|--|-----------------------------|--|--|--|---|
|   | PCR en temps réel                            |                             | FISH   |  | MALDI-TOF  | PCR-ESI   |
|   | Tests classiques                             | Tests intégrés              | PNA-FISH   | sondes ADN $\forall$   |  |   |
| <b>Performances</b>   |  |                             |  |  |  |   |
| <b>Durée du test</b>  | 1h30 à 3h <sup>†</sup>                       | 45min à 2h                  | 2h30   | 30min  | 1 - 2min; plus long si extraction requise                        | 4 - 6h  |
| <b>Sensibilité / Spécificité (contre méthodes conventionnelles)</b>       | Similaires ou meilleures                     | Similaires ou meilleures    | Similaires                                       | Similaires   | Similaires ou meilleures   | Similaires ou meilleures                                |
| <b>Limite de détection</b>  | +/- 10 UFC/mL <sup>†</sup>                   | +/- 10 UFC/mL <sup>†</sup>  | 10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup> UFC/mL         | 10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup> UFC/mL                                     | 10 <sup>5</sup> UFC/mL   | +/- 10 UFC/ml   |
| <b>Nombre de cibles détectées</b>   | Limité                                       | Limité                      | Limité (6 kits, 7 cibles)                        | Limité (2 kits, panel plus large que PNA-FISH)                               | Panel très important   | Panel très important                                    |
| <b>Type de prélèvements</b>   | Tous types                                   | Tous types                  | Hémocultures positives (Tous types) <sup>ϕ</sup> | Hémocultures positives et prélèvements pulmonaires (Tous types) <sup>ϕ</sup> | Colonies isolées (Hémocultures positives et urines) <sup>ϕ</sup> | Tous types  |
| <b>Détection des bactéries rarement isolées</b>                           | Limité                                       | Limité                      | Limité   | Limité   | Oui  | Oui   |
| <b>Détection de bactéries ayant des conditions de cultures difficiles</b> | Oui  | Oui                         | Limité   | Limité (oui pour les prélèvements pulmonaires)                               | Limité (oui pour urines)   | Oui   |
| <b>Technique quantitative</b>   | Oui  | Oui                         | Possible, mais intérêt limité                    | Probablement   | Possible, mais intérêt limité                                    | Oui   |
| <b>Gestion du flux d'échantillons</b>                                     |  |                             |  |  |  |   |
| <b>Place / locaux requis</b>  | Contraignant (4 zones séparées physiquement) | Peu contraignant            | Peu contraignant                                 | Peu contraignant   | Peu contraignant   | Légèrement contraignant (2 zones séparées physiquement) |
| <b>Complexité du test</b>   | Personnel qualifié requis                    | Très simple                 | Simple   | Simple   | Simple   | Simple  |
| <b>Temps de manipulation</b>  | Long (automatisable)                         | Très bref                   | Environ 45 minutes                               | 10min  | Très bref  | Bref  |
| <b>Débit</b>  | Moyen ou haut débit                          | Faible, moyen ou haut débit | Faible   | Faible   | Faible, moyen ou haut  | Moyen ou haut débit                                     |

**Tableau IV (suite)**

| Techniques  | Biologie moléculaire                           |   |                    |                          | Spectrométrie de masse                  |            |
|---|--|---|--------------------|--------------------------|---|------------|
|   | PCR en temps réel                              |   | FISH               |                          | MALDI-TOF                               | PCR-ESI    |
|   | Tests classiques                               | Tests intégrés                                | PNA-FISH           | sondes ADN ‡             |   |            |
| <b>Coûts</b>  |  |   |                    |                          |   |            |
| <b>Investissement pour la mise en place de la technique</b> | Moyen ou élevé selon le degré d'automatisation | Moyen   | Faible             | Faible                   | Elevé                                   | Elevé      |
| <b>Coût du test</b>   | Elevé  | Plus élevé que la PCR en temps réel classique | élevé              | Moins élevé que PNA-FISH | Très faible (quelques centimes d'euros) | Elevé      |
| <b>Personnel</b>  | Elevé  | Faible  | Faible             | Faible                   | Faible                                  | Faible     |
| <b>Références</b>   | 22, 56, 73                                     | 45  | 25, 47, 52, 71, 72 | 68 - 70                  | 6, 7, 11, 20, 23, 24, 43, 48 - 51       | 18, 20, 36 |

**Notes** : min = minutes, h = heures;  
 ‡ sondes ADN "en épingle à cheveux"

† cette limite de détection peut varier selon le gène ciblé et/ou le type de prélèvement;

‡ Comprend le temps d'extraction plus celui de la PCR;

ϕ Types d'échantillons pour lesquels une utilisation de la technique serait possible

Comparaison des quatre techniques décrites ci-dessus selon trois critères : la performance du test, la gestion des flux d'échantillon et les coûts relatifs de chaque technique.

La technique d'amplification des acides nucléiques présente néanmoins de nombreux avantages par rapport à l'amplification naturelle des bactéries. C'est pourquoi quelques **tests hybrides** ont vu le jour, comme la technique de PCR couplée à une détection des produits d'amplification sur **puce à ADN**, permettant l'identification d'un large panel de bactéries. Dernièrement, ces puces à ADN ont été remplacées par la **spectrométrie de masse**, afin d'augmenter les performances du test tout en réduisant les coûts.

Ainsi, la **PCR-ESI** a le potentiel pour être utilisée en routine, à la place des méthodes conventionnelles, pour l'identification des pathogènes. Elle a l'avantage de pouvoir être réalisée à partir de **tous les types de prélèvements cliniques**, mono- comme polybactériens. La technique présente en plus un fort intérêt pour la recherche de marqueurs génétiques de résistances aux antibiotiques, plutôt pour des gènes conservés comme *mecA*, *vanA* et *vanB* que pour des gènes codants pour des BLSE, par exemple. Pour ces derniers, de nombreux types d'enzymes diffèrent par un seul polymorphisme, ce qui se traduit néanmoins par une variation de l'activité enzymatique d'un facteur 100 ou 1 000. Or, une différence d'une base n'est pas suffisante pour permettre une discrimination par la PCR-ESI. En effet, cette méthode "mesure" la composition en bases de séquences d'ADN, et non l'ordre de chacune dans cette séquence. **La détection d'une mutation à une position donnée est donc impossible**, à moins d'utiliser des amorces spécifiques pour chaque zone présentant un polymorphisme.

Parmi les autres techniques de biologie moléculaire, celles basées sur la **FISH** permettent une **identification rapide et facile**, avec un degré de complexité et un temps de manipulation des échantillons plus ou moins comparables à un examen direct après coloration de Gram. Le panel de cibles est encore limité, mais devrait rapidement augmenter, avec notamment le développement de kits pour les infections urinaires. Les panels ciblent toutefois les pathogènes les plus fréquents uniquement, laissant de côté les

bactéries les plus rarement isolées. Si la technique est validée seulement pour l'utilisation à partir d'hémocultures positives ou de prélèvements pulmonaires, une utilisation à partir d'autres types d'échantillons est possible. La technique est **actuellement limitée à l'identification de bactéries**. La société miacom diagnostics, qui commercialise déjà les sondes "en épingle à cheveux" pour la technique de FISH, annonce le développement prochain de tests permettant la **détection de résistances aux antibiotiques**. Ces tests seraient basés sur l'utilisation de sondes reconnaissant spécifiquement des **protéines impliquées dans les mécanismes de résistances**, comme la protéine PLP2a (SARM) ou les pompes à efflux. Des fluorophores pourraient également être fixés sur des **antibiotiques**, ce qui servirait ainsi à suivre la dégradation de ces derniers.

La dernière des techniques décrites ici, la **spectrométrie de masse MALDI-TOF**, permet l'identification d'un large panel de bactéries, avec des performances égales ou supérieures par rapport aux méthodes conventionnelles, pour un coût moindre. Elle a donc le potentiel pour **remplacer ces techniques en routine**, pour l'identification de pathogènes. En revanche, la rapidité de cette technique est très fortement **impactée par le temps de culture des bactéries**. La limite de cette technique est la nécessité de la réaliser à partir d'**échantillons mono-bactérien uniquement**. Elle ne peut donc pas être utilisée directement sur certains types de prélèvements, comme les prélèvements pulmonaires ou du tractus digestif. Les prélèvements qui sont normalement stériles sont dans la majorité des cas mono-bactérien, et une **étape d'extraction des bactéries** peut suffire pour réaliser le test, si la charge bactérienne est suffisante. La **validation de ces protocoles** est tout de même nécessaire car l'environnement des bactéries impacte sur l'expression des gènes, et le protéome bactérien peut varier pour une même souche, selon qu'elle soit dans un environnement liquide et mobile (hémoculture, urines) ou solide et fixe (gélose). La

technique semble tout de même suffisamment robuste pour être appliquée à ces prélèvements.

Toutes ces méthodes de diagnostic rapide montrent un intérêt majeur pour l'identification des bactéries. En revanche, elles ne sont pas aptes à remplacer la technique de référence pour la détection de résistances aux antibiotiques, l'antibiogramme. Les **variants les plus fréquents** peuvent être détectés par l'identification de marqueurs génétiques comme les gènes *mecA*, *vanA*, *vanB*, *parC*, *gyrA* et *bla<sub>KPC</sub>*, mais ils ne couvrent pas toutes les résistances. De plus, lorsque des marqueurs génétiques sont ciblés, il faut prendre en compte l'**expression différentielle des gènes** qui peut biaiser grandement les résultats. Lorsque les protéines sont ciblées, la technique se rapproche plus de l'antibiogramme, mais un **biais entre l'expression de résistance *in vitro* et *in vivo* existe**, même pour la technique de référence. Divers mécanismes de résistances pourraient toutefois être détectés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par FISH:

- **Résistances par inactivation enzymatique de l'antibiotique** : les bactéries peuvent être incubées en présence de l'antibiotique, puis la recherche de **produits de dégradation** de cet antibiotique peut être réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cela permettrait une identification des BLSE, par exemple. L'ajout d'un contrôle interne pour rendre la méthode quantitative, ou semi-quantitative, pourrait même autoriser la distinction des BLSE ayant une forte activité enzymatique, chez les bactéries résistantes aux bêta-lactamines, de celle dont le phénotype se rapproche plus d'une sensibilité intermédiaire à ces mêmes antibiotiques.
- **Résistances par modification de la cible** : la recherche, sur le spectre de masse, de **pics spécifiques d'une protéine mutée**, comme la protéine PLP2a, responsable de

la résistance de *S. aureus* à la méthicilline, permettrait de détecter plusieurs de ces résistances.

- **Les résistances par efflux actif et par imperméabilité** : celles-ci seraient **plus complexes** à détecter par spectrométrie de masse, étant donné que les protéines responsables de la résistance sont situées au niveau de la **membrane externe** des bactéries. La technique MALDI-TOF permettant d'analyser les protéines intracellulaires, il faudrait **bloquer les protéines dans le cytoplasme** des bactéries, entre les étapes de traduction et de migration de ces cibles vers la membrane bactérienne. Il serait alors possible de **détecter une surexpression** des pompes à efflux (méthodes semi-quantitatives) ou une **mutation** des porines. Ces résistances seraient en revanche **facilement identifiables par des techniques de FISH**, les protéines ciblées étant suffisamment exposées pour que des sondes fluorescentes s'y fixent.

#### *Utilisation en routine des tests décrits*

Pour qu'un test diagnostique soit utilisable en routine, il faut qu'il fasse partie de l'ensemble des tests dont le remboursement est assuré par le système de financement des soins. En France, par exemple, le système de la tarification à l'activité, la T2A, repose sur le regroupement des patients en groupes homogènes de malades, les GHM, selon des critères démographiques (e.g. homme/femme, enfant/adulte), des critères pathologiques (e.g. insuffisants rénaux, transplantés), des facteurs de risques associés (e.g. prise préalable d'antibiotiques, hospitalisation en USI, pour les infections nosocomiales) et du type de soins reçus (e.g. ventilation mécanique, sondage urinaire à demeure). Pour chaque GHM ainsi défini, un nombre et des types spécifiques de soins et d'actes diagnostics sont remboursés par la sécurité sociale. Tous frais supplémentaires n'entrant pas dans ce "forfait GHM" sont à la charge de l'hôpital. Les systèmes britannique et américain de



remboursement des soins présentent des variations par rapport au système français, mais une constante est néanmoins toujours présente : l'inclusion d'un test diagnostique dans les actes remboursés faisant partie du "forfait GHM" (ou de l'équivalent selon les pays) repose sur des études médico-économiques. Celles-ci doivent démontrer une utilité clinique et un impact coûts/bénéfice conséquent pour qu'un test soit retenu, et donc utilisable en routine dans les laboratoires de microbiologie clinique.

Des études interventionnelles ont ainsi démontré l'avantage majeur de l'utilisation des tests de PNA-FISH par rapport aux méthodes conventionnelles, notamment pour l'identification des SCN. Elles ont en effet apporté la preuve d'une réduction statistiquement significative de la morbi-mortalité et des coûts de la prise en charge des patients. Pour la technique de PCR en temps réel, ces études ont rarement été réalisées. Le test de détection des SARM, par l'identification du gène *mecA*, présente un intérêt suffisant pour valider son utilisation en routine, principalement pour le dépistage de ces SARM à grande échelle, afin de réduire le temps d'isolement des patients au début de l'hospitalisation. En revanche, beaucoup de tests commerciaux (e.g. tests SeptiFast, Roche) comme de tests "maison" (tests créés et validés par un service hospitalier) n'ont pas été validés par une étude médico-économique, ou n'ont démontré qu'une utilité clinique modérée voir nulle, ainsi qu'un rapport coûts/bénéfice non satisfaisant. C'est pourquoi l'utilisation en routine des tests de PCR en temps réel, dans le cadre des infections nosocomiales, reste limitée à quelques applications spécifiques (e.g. recherche de SARM ou d'ERV, identification de *C. difficile* dans les selles, diagnostic précoce de méningites bactériennes).

Pour les techniques de spectrométrie de masse, si quelques études comparant leurs performances par rapport aux méthodes conventionnelles ont également abordé le sujet du coût par test, cela ne suffit pas. Il faudra la réalisation d'études interventionnelles, analysant l'évolution d'une part de critères de morbi-mortalité (e.g. la durée de séjour, la

durée de port de cathéter urinaire et/ou intravasculaire, le traitement devant être mis en place, les effets indésirables et les complications entraînées, le temps de rééducation nécessaire, le temps de récupération des fonctions cognitives et/ou motrices nécessaires à la reprise d'une activité ou d'un emploi, le taux de mortalité global ou selon le type de service hospitalier étudié, etc...) et d'autre part les coûts globaux de prise en charge des patients, sur une période conséquente. C'est seulement après l'examen des résultats de ces études que ces techniques pourront remplacer les méthodes conventionnelles au sein des laboratoires de microbiologie clinique pour un grand nombre d'applications, comme pour le diagnostic rapide des infections, nosocomiales comme communautaires, le typage et le suivi de souches épidémiques ou encore le suivi des mesures d'hygiène et de prévention des infections. Le développement de ces techniques pour l'identification rapide d'un très large panel de mécanismes de résistances aux antibiotiques permettrait également la mise en place de mesures d'isolement et de décolonisation des patients porteurs d'organismes multirésistants. Ces mesures ont démontré leur intérêt dans l'exemple des SARM dont la prévalence a cessé d'augmenter dans plusieurs pays européens. Il est donc très important de valider et d'améliorer ces techniques, puisque le contrôle de la qualité des soins et des résistances aux antibiotiques devrait figurer parmi les enjeux majeurs de santé publique, au cours du 21<sup>ème</sup> siècle.

**THESE SOUTENUE PAR :** Thibault MONNET

**TITRE :** Les **infections nosocomiales** : l'importance du suivie épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause. Exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce.

## Conclusion

Les infections nosocomiales ont un impact majeur de santé publique. La prévalence de ces infections est de 7,1% dans les pays industrialisés, et de 10% à 15% dans les pays en voie de développement. Les services les plus touchés sont les unités de soins intensifs, en partie en raison de la sévérité des pathologies des patients concernés, en partie parce que le taux de dispositifs médicaux utilisés est plus important que dans le reste de l'hôpital. L'utilisation de ces dispositifs médicaux est fréquemment associée au développement d'infections nosocomiales. Ces infections sont causées majoritairement par des bactéries, qui présentent souvent des profils de résistances aux antibiotiques, ce qui complique la prise en charge de ces infections.

La morbi-mortalité associée au développement d'infections nosocomiales est importante, avec notamment l'augmentation de la durée d'hospitalisation, ce qui entraîne des surcoûts importants. La mortalité associée aux infections nosocomiales varie entre 12% et 80%, selon la population de patients concernée et le type d'infection. Ces pathologies seraient pourtant évitables dans 20% à 30% des cas, surtout lorsqu'elles sont associées à l'utilisation de dispositifs médicaux.

Le diagnostic de ces infections repose sur des critères cliniques, radiologiques, biologiques et microbiologiques. Les trois premiers critères manquent de sensibilité et de spécificité, alors que l'examen microbiologique est long et laborieux. Une identification du pathogène responsable de l'infection demande souvent plus de 2 à 5 jours, et le profil de résistance aux antibiotiques est plus long à définir. Les patients doivent être traités le plus tôt possible, et devant le temps requis pour l'identification du pathogènes en cause, c'est une antibiothérapie empirique qui est mise en place. Elle s'appuie sur des critères épidémiologiques et démographiques, d'où l'importance d'un suivi épidémiologique au sein des hôpitaux, selon le type d'infections nosocomiales. Malheureusement, l'antibiothérapie empirique est inadaptée dans bien des cas, et la mise en place tardive d'un traitement efficace, réadapté en fonction des données microbiologiques, est associée à une augmentation conséquente de la

morbi-mortalité et des surcoûts hospitaliers. Des méthodes de diagnostic rapides, identifiant le pathogène et son profil de résistance dans les 24 heures suivant le prélèvement, sont donc nécessaires.

Parmi ces méthodes, les plus prometteuses semblent être les techniques basées sur la spectrométrie de masse. Leurs performances, ainsi que le large panel de bactéries détectées, permettent une utilisation en routine. On peut aisément imaginer le remplacement des méthodes conventionnelles, dans un avenir assez proche, par les techniques de MALDI-TOF et/ou de PCR-ESI, pour l'identification de pathogènes. Les techniques de FISH et de PCR en temps réel ne peuvent pas être utilisées indépendamment de méthodes conventionnelles ou de spectrométrie de masse, le panel de pathogène couvert étant trop limité. En revanche, elles peuvent être réalisées en complément de ces méthodes, pour identifier rapidement les pathogènes les plus fréquents, pour les cas d'urgence comme lors de la suspicion de méningites, par exemple, ou pour la confirmation d'un diagnostic.

Pour les mêmes raisons, la culture des bactéries ne peut pas être abandonnée actuellement, l'antibiogramme restant la technique de référence pour la détection de résistances aux antibiotiques. Les techniques plus rapides permettraient une identification de marqueurs spécifiques, mais trop de résistance ne sont pas couvertes, et un antibiogramme est souhaitable pour confirmer les résultats de ces techniques. En effet, les biais entre les marqueurs génétiques, les marqueurs protéiques, la croissance du pathogène en présence de l'antibiotique *in vitro* et le comportement de ce pathogène *in vivo*, confronté à ce même antibiotique, sont trop importants. Néanmoins, l'optimisation de ces technologies pourraient peut être, un jour, permettre l'identification de tous les mécanismes de résistance connus en quelques heures seulement.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 22/11/2011

LE DOYEN  
Pr Christophe RIBUOT

LE PRESIDENT DE LA THESE  
Pr Michel SEVE



  
UFR Pharmacie  
Département Mécanismes Biologiques  
des Maladies et Traitements  
Université Joseph Fourier  
Grenoble

# Bibliographie

## Articles de périodique :

- (1) ALLEGIANZI B, BAGHERI NEJAD S, COMBESURE C, *et al.* Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2011, **377** : 228-241.
- (2) ANHALT JP, FENSELAU C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. *Anal. Chem.* 1975, **47** : 219–225.
- (3) BAGHERI NEJAD S, ALLEGIANZI B, SYED SB, ELLIS B, PITTET D. Health-care-associated infection in Africa: a systematic review. *Bull. World Health Organ.*, 2011, **89** : 757–765
- (4) BARBUT, F, MASTRANTONIO P, DELMÉE M, BRAZIER J, KUIJPER E, POXTON I. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, **13** : 1048-1057.
- (5) BARENFANGER J, DRAKE C, KACICH G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37** : 1415-1418.
- (6) BIZZINI A, DURUSSEL C, BILLE J, GREUB G, PROD'HOM G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2010, **48** : 1549-1554.
- (7) BIZZINI A, JATON K, ROMO D, BILLE J, PROD'HOM G, GREUB G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49** : 693-696.
- (8) BROWN AR, GOVAN JRW. Assessment of fluorescent in situ hybridization and PCR-based methods for rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex organisms directly from sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45** : 1920-1926.
- (9) CAMARA JE, HAYS FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2007, **389** : 1633-1638.
- (10) CHASTRE J, FAGON J-Y. Ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002, **165** : 867-903.
- (11) CHERKAOUI A, HIBBS J, EMONET S, *et al.* Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 2010, **48** : 1169-1175.
- (12) CERQUEIRA L, FERNANDES RM, FERREIRA RM, *et al.* PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol.* 2011, **11** : 101-107.

- (13) COSGROVE SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs.  
*Clin. Infect. Dis.* 2006, **42**, Suppl. 2 : 82-89.
- (14) DAVEY PG, MARWICK C. Appropriate vs. inappropriate antimicrobial therapy.  
*Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, **14**, Suppl. 3 : 15-21.
- (15) DICKINSON JD, KOLLEF MH. Early and adequate antibiotic therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock.  
*Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2011, **13** : 399-405.
- (16) DUDECK MA, HORAN TC, PETERSON KD, *et al.* National Healthcare Safety Network (NHSN) report, data summary for 2009, device-associated module.  
*Am. J. Infect. Control*, 2011, **39** : 349-367.
- (17) ECKER DJ, SAMPATH R, MASSIRE C, *et al.* Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology.  
*Nat. Rev. Microbiol.* 2008, **6** : 553-558.
- (18) ECKER DJ, SAMPATH R, LI H, *et al.* New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections.  
*Expert Rev. Mol. Diagn.* 2010, **10** : 399-415.
- (19) EGGERTSON L. *C. difficile*: by the numbers.  
*CMAJ.*, 2004, **171** : 1331-1332.
- (20) EMONET S, SHAH HN, CHERKAOUI A, SCHRENZEL J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology.  
*Clin. Microbiol. Infect.* 2010, **16** : 1604-1613.
- (21) ENDIMIANI A, HUIER KM, HUIER AM, *et al.* Are we ready for novel detection methods to treat respiratory pathogens in hospital-acquired pneumonia?  
*Clin. Infect. Dis.* 2011, **52**, Suppl. 4 : 373-383.
- (22) ESPY MJ, UHL JR, SLOAN LM, *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing.  
*Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, **19** : 165-256.
- (23) FERREIRA L, SANCHEZ-JUANES F, GONZALEZ-AVILA M, *et al.* Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.  
*J. Clin. Microbiol.* 2010, **48** : 2110-2115.
- (24) FERRONI A, SUAREZ S, BERETTI J-L, *et al.* Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.  
*J. Clin. Microbiol.* 2010, **48** : 1542-1548.
- (25) FORREST GN, MEHTA S, WEEKES E, LINCALIS DP, JOHNSON JK, VENEZIA RA. Impact of rapid in situ hybridization testing on coagulase-negative staphylococci positive blood cultures.  
*J. Antimicrob. Chemother.* 2006, **58** : 154-158.
- (26) FORREST GN, ROGHMANN M-C, TOOMBS LS, *et al.* Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier effective antimicrobial therapy.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52** : 3558-3563.

- (27) FOURNIER P-E, VALLENET D, BARBE V, ET AL. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.*, 2006, **2** : e7.
- (28) GASTMEIER P, GEFTERS C. Prevention of catheter-related bloodstream infections: analysis of studies published between 2002 and 2005. *J. Hosp. Infect.*, 2006, **64** : 326-335.
- (29) GASTMEIER P, GEFTERS C. Prevention of ventilator-associated pneumonia: analysis of studies published since 2004. *J. Hosp. Infect.*, 2007, **67** : 1-8.
- (30) HARBARTH S, SAX H, GASTMEIER P. The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports. *J. Hosp. Infect.*, 2003, **54** : 258-266.
- (31) HIDRON AI, EDWARDS JR, PATEL J, *et al.* NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 2008, **29** : 996-1011.
- (32) HOLLAND RD, WILKES JG, RAFII F, *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, **10** : 1227-1232.
- (33) HORAN TC, ANDRUS M, DUDECK MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control*, 2008, **36** : 309-332.
- (34) JOSEPH R, DEMEYER D, VANRENTERGHEM D, VAN DEN BERG R, KUIJPER E, DELMÉE M. First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. *Euro Surveill.*, 2005, **10** : E051020.4.
- (35) LEDEBOER NA, HODINKA RL. Molecular Detection of Resistance Determinants. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, **49**, Suppl. 9 : 20-24.
- (36) KALETA EJ, CLARK AE, JOHNSON DR, *et al.* Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49** : 345-353.
- (37) KIRKETERP-MØLLER K, JENSEN PØ, FAZLI M, *et al.* Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46** : 2717-2722.
- (38) KLEVENS RM, EDWARDS JR, RICHARDS CL Jr, *et al.* Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep.*, 2007, **122** : 160-166.
- (39) KUIJPER EJ, BARBUT F, BRAZIER JS, *et al.* Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill.*, 2008, **13**.
- (40) KUMAR A, ELLIS P, ARABI Y, *et al.* Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 2009, **136** : 1237-1248.

- (41) LOO VG, POIRIER L, MILLER MA, *et al.* A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N. Engl. J. Med.*, 2005, **353** : 2442-2449.
- (42) LY T, GULIA J, PYRGOS V, WAGA M, SHOHAM S. Impact upon clinical outcomes of translation of PNA FISH-generated laboratory data from the clinical microbiology bench to bedside in real time. *Ther Clin Risk Manag.* 2008, **4** : 637-640.
- (43) MELLMANN A, CLOUD J, MAIER T, *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46** : 1946-1954.
- (44) MUTO CA, POKRYWKA M, SHUTT K, *et al.* A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 2005, **26** : 273-280.
- (45) NIEMZ A, FERGUSON TM, BOYLE DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol.* 2011, **29** : 240-250.
- (46) PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008, **21** : 538-582.
- (47) PELEG AY, TILAHUN Y, FIANDACA MJ, *et al.* Utility of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 2009, **47** : 830-832.
- (48) PROD'HOM G, BIZZINI A, DURUSSEL C, BILLE J, GREUB G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J. Clin. Microbiol.* 2010, **48** : 1481-1483.
- (49) RISCH M, RADJENOVIC D, HAN JN, WYDLERM, NYDEGGER U, RISCH L. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Med Wkly.* 2010, **140** : w13095.
- (50) SAFFERT RT, CUNNINGHAM SA, IHDE SM, JOBE KE, MANDREKAR J, PATEL R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49** : 887-892.
- (51) SENG P, DRANCOURT M, GOURIET F, *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009, **49** : 543-551.
- (52) SOGAARD M, STENDER H, SCHONHEYDER HC. Direct identification of major blood culture pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, by a panel of fluorescence in situ hybridization assays using peptide nucleic acid probes. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43** : 1947-1949.



- (53) SUH M-J, LIMBACH PA. Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*. 2004, **10** : 89-99.
- (54) SUPPLI M, AABENHUS R, HARBOE ZB, ANDERSEN LP, TVEDEM and JENSEN JU. Mortality in enterococcal bloodstream infections increases with inappropriate antimicrobial therapy. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, **17** : 1078-1083.
- (55) SZABADOS F, WOLOSZYN J, RICHTER C, KAASE M, GATERMANN S. Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database. *J. Med. Microbiol.* 2010, **59** : 787-790.
- (56) TSE C, CAPEAU J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin.*, 2003, **61** : 279-293.
- (57) VAN STEENBERGEN J, DEBAST S, VAN KREGTEN E, VAN KREGTEN E, VAN DEN BERG R, NOTERMANS D, KUIJPER E. Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Euro Surveill.*, 2005, **10** : E050714.1
- (58) WAGENLEHNER FME, CEK M, NABER KG, KIYOTA H, BJERKLUND-JOHANSEN TE. Epidemiology, treatment and prevention of healthcare-associated urinary tract infections. *World J. Urol.*, 2011.  
Publié en ligne le 07 Septembre 2011 – Consulté en Octobre 2011  
URL : <http://www.springerlink.com/content/a31517722w370557/>
- (59) WEINSTEIN MP, DOERN GV. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, **49**, Suppl. 9 : 26-29.
- (60) WOLK DM, DUNNE WM. New Technologies in Clinical Microbiology. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, **49**, Suppl. 9 : 62-67.
- (61) ZILBERBERG MD, SHORR AF, MICEK ST, MODY SH, KOLLEF MH. Antimicrobial therapy escalation and hospital mortality among patients with health-care-associated pneumonia: a single-center experience. *Chest*, 2008, **134** : 963-968.
- (62) ZILBERBERG MD, SHORR AF, MICEK ST, *et al.* Hospitalizations with healthcare-associated complicated skin and skin structure infections: impact of inappropriate empiric therapy on outcomes. *J. Hosp. Med.*, 2010, **5** : 535-540.

### *Sites internet :*

Rapports de l'ECDC - URL : <http://ecdc.europa.eu/>

(63) EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL: Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008.

Stockholm: ECDC, 2008.

URL : [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC\\_DispForm.aspx?ID=328](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=328)

Consulté en Octobre 2011

(64) EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

Stockholm: ECDC, 2010.

URL : [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC\\_DispForm.aspx?ID=580](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=580)

Consulté en Octobre 2011

(65) EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL: Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010.

Stockholm : ECDC, 2010.

URL : [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC\\_DispForm.aspx?ID=578](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=578)

Consulté en Octobre 2011

Rapports de l'OMS – URL : <http://www.who.int/fr/>

(66) DUCEL G, FABRY J, NICOLLE L. Prevention of Hospital-acquired infections: a practical guide (2<sup>nd</sup> ed). 2002, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12

URL :

[http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002\\_12/fr/index2.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/fr/index2.html)

Consulté en Octobre 2011

(67) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide: a systematic review of the literature. Geneva, World Health Organization, 2011.

URL : [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501507\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501507_eng.pdf)

Consulté en Octobre 2011

Autre :

(68) Site internet de la société miacom diagnostics. URL : <http://miacom-diagnostics.com>

Consulté en Novembre 2011

## Posters

(69) KRAUTER V, BLÖMEKE E, THRIFFLETON I, *et al.* Identification of pathogens directly from respiratory specimens from patients with HAP within 40 minutes.

Congrès de Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 2011, Dresde

URL :

[http://miacom-diagnostics.com/images/stories/miacom/panels/hap\\_vap\\_study\\_dus\\_dgp\\_2011.pdf](http://miacom-diagnostics.com/images/stories/miacom/panels/hap_vap_study_dus_dgp_2011.pdf)

Consulté en Novembre 2011

(70) MAKRISTATHIS A, RISS S, HIRSCHL AM. A novel FISH test for rapid pathogen identification in positive blood cultures.

Congrès de l'European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010, Milan.

URL:

[http://miacom-diagnostics.com/images/stories/miacom/panels/blood\\_culture\\_study\\_vienna\\_eccmid%202011.pdf](http://miacom-diagnostics.com/images/stories/miacom/panels/blood_culture_study_vienna_eccmid%202011.pdf)

Consulté en Novembre 2011

(71) MELTZER MC, BUCKNER RJ, FIANDACA MJ, *et al.* Rapid identification of microorganisms in bronchoalveolar lavage using PNA FISH.

Congrès de l'American Society of Microbiology, 2010, San Diego.

URL :

[http://www.advandx.com/uploads/documents/asm\\_2010\\_poster\\_c1585\\_pna\\_fish\\_for\\_bals.pdf](http://www.advandx.com/uploads/documents/asm_2010_poster_c1585_pna_fish_for_bals.pdf)

Consulté en Octobre 2011

(72) TRNOVSKY J, KLIMAS L, FULLER D, STENDER H. Direct detection and identification of bacteria in urine using PNA FISH.

Congrès de l'American Society of Microbiology, 2010, San Diego.

URL :

[http://www.advandx.com/uploads/documents/asm\\_2010\\_poster\\_c1088\\_pna\\_fish\\_for\\_urine.pdf](http://www.advandx.com/uploads/documents/asm_2010_poster_c1088_pna_fish_for_urine.pdf)

Consulté en Octobre 2011

## Ouvrage

(73) DENIS F, PLOY M-C, MARTIN C, BINGEN E, QUENTIN R. Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson; 2007.



## **Serment de Galien**



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

**THESE SOUTENUE PAR :** Thibault MONNET

**TITRE :** Les infections nosocomiales : l'importance du suivie épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause. Exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce.

## Résumé

Les infections nosocomiales, ou infections contractées au cours de soins hospitaliers, ont un impact majeur de santé publique. La prévalence de ces infections est de 7,1% dans les pays industrialisés, et de 10% à 15% dans les pays en voie de développement. Les unités de soins intensifs sont les services les plus touchés. Ces infections sont causées principalement par des bactéries. Le développement des infections nosocomiales s'accompagne de morbi-mortalités importantes, entraînant des surcoûts hospitaliers estimés à 7 milliards d'euros par an en Europe, 6,5 milliards de dollars par an aux USA. Ces infections nosocomiales sont pourtant évitables dans plus d'un cas sur cinq.

L'augmentation de ces morbi-mortalités est en partie associée à la mise en place d'une antibiothérapie empirique, bien souvent inadaptée et sans bénéfice clinique, à cause du temps nécessaire à l'examen microbiologique. En effet, les méthodes conventionnelles d'identification de pathogènes et de résistances aux antibiotiques, basées sur la culture des pathogènes, sont longues et laborieuses, avec un résultat obtenu plus de 2 à 5 jours après le prélèvement. Des techniques de diagnostic rapide existent, permettant de réduire ce délai à moins de 24h. Parmi ces techniques, sont décrites dans cette thèse la PCR en temps réel, la technique de FISH, la spectrométrie de masse MALDI-TOF et finalement la PCR couplée à la spectrométrie de masse, PCR-ESI. Ces techniques présentent de nombreux avantages pour l'identification de pathogènes, mais ont besoin d'être améliorées pour la détection d'un plus large panel de résistances aux antibiotiques.

**Mots clés :** Infections nosocomiales, épidémiologie, morbi-mortalité, tests de diagnostic rapides, PCR en temps réel, FISH, MALDI-TOF, PCR-ESI.

---

THESE SOUTENUE LE 9 DECEMBRE 2011, DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Pr Michel SEVE, PharmD, PhD

Directeur de Thèse : Dr Javier YUGUEROS MARCOS, PhD

Membres :

Dr Jean BRETON, PharmD, PhD

Pr Max MAURIN, MD, PhD

Contact :

- par mail : thibault.monnet@laposte.net

- par courrier (exceptionnellement) : Thibault MONNET – 64 rue de la chevalerie – 38210 TULLINS