

Épidémiologie de la résistance aux carbapénèmes de Pseudomonas Aeruginosa dans 3 services de réanimation français : études des mécanismes de résistance et évaluation des tests phénotypiques de dépistage des carbapénémases

Alexandre Massri

▶ **To cite this version:**

Alexandre Massri. Épidémiologie de la résistance aux carbapénèmes de Pseudomonas Aeruginosa dans 3 services de réanimation français : études des mécanismes de résistance et évaluation des tests phénotypiques de dépistage des carbapénémases. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01493599

HAL Id: dumas-01493599

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01493599

Submitted on 21 Mar 2017

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.

Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2016 N°3159

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 octobre 2016 à Bordeaux

Par **Alexandre MASSRI**

Né le 27 août 1987 à Guéret (23)

Epidémiologie de la résistance aux carbapénèmes de *Pseudomonas Aeruginosa* dans 3 services de réanimation français : Etudes des mécanismes de résistance et évaluation des tests phénotypiques de dépistage des carbapénémases

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Alexandre BOYER

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Alexandre OUATTARA	Président du jury
Madame le Professeur Véronique DUBOIS	Juge
Monsieur le Professeur Didier GRUSON	Juge
Monsieur le Docteur Walter PICARD	Juge
Monsieur le Professeur Alexandre BOYER	Juge

Rapporteur :

Madame le Docteur Eloïse MORISSE

Remerciements :

Aux membres du jury

Monsieur le Professeur Alexandre OUATTARA, Président du jury

Professeur des universités, Praticien Hospitalier

Coordinateur régional du DES d'Anesthésie-Réanimation

Chef du Service d'Anesthésie-Réanimation II

CHU de Bordeaux

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse, je vous en remercie, ainsi que pour votre engagement pédagogique et médical, et votre disponibilité tout au long de ces 5 années d'internat. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance, et de mon plus grand respect.

Madame le Professeur Véronique DUBOIS, membre du jury

Professeur des universités, Praticien Hospitalier

Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité UMR-CNRS 5234- Université de Bordeaux

Service de Bactériologie

CHU de Bordeaux

Soyez assurée de ma reconnaissance sincère, pour avoir accepté de juger ce travail, et pour l'avoir rendu possible, en y collaborant et en lui faisant bénéficier de votre expertise.

Monsieur le Professeur Didier GRUSON, membre du jury

Professeur des universités, Praticien Hospitalier

Service de réanimation médicale

CHU de Bordeaux

Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail, d'y avoir participé, et d'accepter de le juger aujourd'hui. J'ai beaucoup apprécié mon passage à l'aile 1. Tes connaissances, tes qualités humaines et pédagogiques sont un exemple pour la pratique de mon exercice futur. Sois assuré de ma profonde considération.

Monsieur le Docteur Walter PICARD, membre du jury

Praticien Hospitalier

Service de réanimation polyvalente

Centre Hospitalier de Pau

Merci de me faire l'honneur d'accepter de juger ce travail aujourd'hui. J'admire tes connaissances et ta rigueur. Merci pour ton accueil dans le service, c'est un honneur et un plaisir de vous rejoindre.

Monsieur le Professeur Alexandre BOYER, directeur de thèse et membre du jury

Professeur des universités, Praticien Hospitalier

Service de réanimation médicale

CHU de Bordeaux

Effectuer ce travail, que j'espère à la hauteur de tes attentes, sous ta direction fut un apprentissage riche. Ta confiance, ta disponibilité, ton soutien, ton accompagnement m'ont permis de le mener à son terme, malgré les contraintes. Je tiens à t'exprimer toute mon amitié, ma considération, et ma sincère reconnaissance.

Au rapporteur

Madame le Docteur Eloïse MORISSE

Praticien Hospitalier

Service de réanimation polyvalente

Centre Hospitalier de Pau

Merci de m'avoir consacré du temps pour lire et juger ce travail. Merci pour tes commentaires avisés, mais aussi pour ton compagnonnage pendant ces 6 mois passés ensemble à Pau. C'est un honneur et un plaisir de vous rejoindre.

A celles qui ont collaboré à ce travail :

Madame le Docteur Fatima M'Zali

Directrice de l'unité Aquitaine Microbiologie

Merci de m'avoir accueilli, d'avoir guidé mes premiers pas dans le monde de la recherche, et d'avoir mis à disposition ton équipe et tes moyens. Ton énergie, tes idées, et l'étendue de ta culture scientifique sont pour moi source d'admiration. Thanks

Audrey Payet, Emilie Pauquet, Marion Saly

Merci pour les manips…

Suzanne Champion

Merci pour ton aide et tes précieux conseils, depuis le début de mon internat.

A mes proches :

A Inès :

Merci d'avoir pris soin de moi, de m'avoir supporté chaque jour. Merci pour l'amour que tu me portes, pour ta patience, pour tes yeux revolver. Tu es ma thésarde préférée. Je t'aime

A ma famille :

A mes parents, pour m'avoir donné, par leur amour et leur éducation, les clés pour réussir et comprendre ce monde. Pour m'avoir enrichi de leurs cultures complémentaires et de leurs valeurs communes.

A mon grand frère, pour avoir défriché le passage de la vie, pour avoir toujours été mon complice, mon partenaire de glisse.

A ma petite sœur, pour son amour, son courage, et pour m'avoir fait ressentir l'envie d'être un exemple pour quelqu'un.

A ma grand-mère Suzanne, qui a traversé le siècle avec le sourire, qui a élevé avec amour 3 générations. Pour ton bon sens et ton courage…et ton pâté aux pommes de terre.

A Jeddo et Setto, pour leur capacité infinie d'aimer, leur courage et leur bonté. Qu'ils reposent en paix

Aux autres membres de ma grande famille, de France et du Liban.

A mes amis :

A Claire, la plus ancienne de tous, pour avoir toujours été là, des bancs de la 6ème aux sessions trombinoscope du dimanche en D4…félicitations docteur !

A khayé Moussa, le plus généreux, le plus dévoué des amis. Pour tous ces moments partagés. Vive les mariés !

Aux Mousquetaires : Athos Charazac, D'Artagnan Rathigue, Aramis Viala, et Albert Monseau, pour avoir calé Hambourg, et pour les sous-colles houblonnées

A papa Soum

Aux surdoués ordinaires, Tricard et Faber

A Vernu, son or et sa chaussure

Aux locataires de la Maison du Peuple : Max E (la qualité allemande), cousin Rémi, Valentin Poisson, et Arthur la tortue ninja

Aux princesses BBCC : Bérengère, Valentine, Léa, Myriam, Isaline, Julie, Potapova

Aux limougeauds de Bordeaux :

A Simon, pour tout ce que l'on a partagé, ce que l'on a appris ensemble, toutes les prises en charge (bonnes ou mauvaises), à toi de jouer maintenant *gringo* !

A Fanette, on compte sur *vous* pour venir nous voir !

A Arni (docteur Ride, anesthésiste…), Lulu et Rousti le Yéti, Léonidas Caballero et Léa, Jambeàmain, El Perro de Talus et Elo, Cond et Manel, Anne-So, Laura Cétran…pour tous ces bons moments, et pour votre amitié

A mes colocataires préférées : Sophie Borgia et Bréalita, j'espère vous manquer autant que je déteste faire le ménage. On a bien rigolé

A mes amis, co-internes et collègues :

Amis anesthésistes : Antoine et Barbara Girondeau, Pierre-André (L'autre *PA*, le bon !), Simon Perrin (notre Jérôme Kerviel local), Marionnée Scotty, Sarah ☺, Foulfoul, Seb, Julia, Elsa, Nico, Mimi, Caro Calot, et les plus jeunes…

Les bayonnais : Vincent el rapacito, Léa Gégé notre mama, Maïdou, Gauthier, Hilal Pamuk, Julie Commeny

Les palois : Flavinou de la Houma (Tu es trop bien pour ce monde), Julie DapDap. Partager votre quotidien a été un plaisir, Rémy Chevalier

L'équipe d'anesthésie de l'hôpital de Bayonne, pour nous avoir accompagnés dans nos premiers pas.

L'équipe de feu l'Unité 11 à Saint-André : Papa Ghani Mesli, Stéphane Winnock, Michel Madras, Vincent Lortet, Laurent Lefèvre, Céline Triboulet, Florence Mary, Claudine Fillaudeau, Benoît Gentil, pour avoir supporté nos errements de débutants

L'équipe de réanimation polyvalente de l'hôpital de Périgueux : Yannick Monseau, Pierre-Henri Dessalles, Pierre Delour, Mélanie Saint-Léger, Sandrine Bedon. Merci pour m'avoir si bien accueilli et tant appris, merci pour votre confiance. Merci à mon co-interne Florent Guerville pour ses conseils.

Les équipes d'anesthésie de la maternité de Pellegrin, du Centre François-Xavier Michelet, de l'hôpital pédiatrique, l'équipe de thoracique à la MHL.

L'équipe de la réanimation de l'hôpital de Pau : Philippe Badia, Paul Aye, Eloïse Morisse, Walter Picard, Jean-Noel Drault, Caroline Sabatier, Franck Descamps

Merci de nous avoir si bien accueillis, pour votre dynamisme, votre solidarité, votre bonne humeur.

Merci de votre confiance, je suis honoré et impatient de rejoindre votre équipe.

Les membres de l'équipe de réanimation médicale Pellegrin que je n'ai pas encore cités : Benjamin Clouzeau le marathonien, Nam Bui, Professeurs Hilbert et Vargas, Dr Pillet. Merci pour votre accueil et votre enseignement.

Chloée Gisbert, notre best CCA !

Charline Sazio, Aurélie Martin

Toto, Fufu et Jojo, des co-internes de rêve ! Je ne vous oublierai pas.

L'équipe d'anesthésie-réanimation des urgences Pellegrin, qui m'a beaucoup appris :

Marie Moisan : Merci chef pour savoir cheffer ! Aussi pour tes conseils avisés, ton humour, ta bonne humeur et ta bienveillance.

Laurent Stecken : Pour ton humilité, ta sagesse, ton engagement et ton humanité sont un modèle.

Peter Meynieu : Merci pour tes conseils, ta gentillesse et ton accompagnement

Julien Rogier et Philippe Revel : Merci de nous faire partager votre expérience et votre bon sens

Patrick Lassié et Michel Galinski

L'équipe de la réanimation chirurgicale :

Jean-François Cochard : Merci pour votre gentillesse, et vos connaissances livresques !

Laurent Petit, Vincent Cottenceau, Mélanie Lafitte : Pour votre accueil, votre expertise et vos conseils avisés en traumatologie

Cédric Carrié : Merci pour ton infatigable énergie, ta volonté de fer et tes connaissances précieuses

Mes co-internes adorés, qui ont couvert mes multiples absences-labo, et rendu ces 6 mois plus agréables : Abdelaïde le caïd, Chloée, Elsa, Kheir abou dhahab, Merry le Croqueur

A ceux qui débutent l'aventure paloise avec moi :

Chacha la pleupleu : Pour ton infinie gentillesse, ta générosité, ton talent

Antoine et Audrey, j'espère être à la hauteur

Stan : Hâte que tu nous rejoignes !

Enfin, merci à tous ceux qui m'ont montré l'exemple à suivre, et celui à ne pas suivre.

Table des matières

Résumé : 10

Abréviations : 11

1. Introduction 13

1.1. Rappels sur Pseudomonas aeruginosa : 13

1.1.1 Présentation générale et épidémiologie 13

1.1.2 Mécanismes de résistance constitutionnels 15

1.1.3 Mécanismes de résistance acquise 17

1.1.4 Carbapénèmes et carbapénémases : 21

1.1.5 Epidémiologie de la résistance de *PA* aux antibiotiques 29

1.1.6 Multirésistance et pronostic 33

1.1.7 Lecture interprétative de l'antibiogramme : 34

1.2. Tests des mécanismes de résistance aux carbapénèmes : 36

1.2.1 Phénotypiques 37

- Tests d'inhibition « simples » : 37
- Tests combinés : 39
- Tests enzymatiques : 39

1.2.2 Génotypiques : 39

1.3. Enjeux du diagnostic rapide 40

1.3.1. A l'échelle individuelle : optimisation de la stratégie antibiotique : 41

1.3.2. A l'échelle du service : Prévention des épidémies : 42

1.4 Rationnel et objectifs de l'étude : 43

2. Matériel/Méthode 44

2.1 Organisation de la recherche : 44

2.2 Origine des souches de *PA* : 45

2.3 Critères d'inclusion et d'exclusion : 45

2.4 Tests diagnostiques phénotypiques : 46

2.4.1 Lecture interprétative de l'antibiogramme : 46

2.4.2 Tests phénotypiques simples : 47

2.4.3 Tests phénotypiques combinés : 50

2.4.4 Tests phénotypiques enzymatiques 52

2.5 Analyse génotypique de confirmation : 53

2.5.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) : 53

2.5.2 Tests d'hybridation (Southern Blot) :..... 53
2.6 Analyse de concordance des résultats..... 54
3. Résultats 54
3.1 Description des souches incluses : 54
3.2 Résultats de la lecture interprétative de l'antibiogramme..... 56
3.3 Résultats des tests phénotypiques..... 56
3.4 Résultats de l'analyse génotypique..... 62
3.5 Concordance 63
4. Discussion 65
5. Conclusion.....72
Références : 73
Serment d'Hippocrate 80

Résumé :

Introduction :

La résistance de *Pseudomonas Aeruginosa* (*PA)*, premier pathogène en réanimation, aux carbapénèmes augmente à l'échelle mondiale. L'apparition de carbapénémases est problématique. De nombreux tests rapides de dépistage des carbapénémases ont été développés chez les entérobactéries, mais peu évalués chez *PA*.

Objectif :

Evaluer la part respective des différents mécanismes de résistance de *PA* aux carbapénèmes dans 3 services de réanimation français. Comparer les résultats des tests phénotypiques et de la lecture interprétative de l'antibiogramme au *Gold Standard* génotypique.

Matériel et méthode :

Etude ancillaire du PHRC Dynapyo ayant étudié les souches de *PA* acquises dans 10 services de réanimation français en 2009. Les souches de *PA* résistantes à l'IMIPENEME et/ou au MEROPENEME issues de 3 des services étaient incluses.

Les BLSE (β-lactamases à spectre étendu) étaient recherchées par synergie au clavulanate. Les carbapénémases étaient recherchées par les tests suivants : analyse de l'antibiogramme, test à l'Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit, Mastdiscs ™ Carbapenemase Detection Set®, Mastdiscs ™ CAT-ID™, Rapidec® Carba NP-test. Les gènes de BLSE et de carbapénémases étaient recherchés par PCR. 2 souches témoins positives pour métallo-carbapénémases étaient utilisées pour comparer tests phénotypiques et génotypiques.

Résultats :

Sur 47 souches analysées, aucune n'était porteuse de carbapénémase, 2 (4,3%) étaient porteuses de BLSE, 12 (25,5%) de céphalosporinase *AmpC* hyperproduite, 33 (70,2%) de mécanismes d'efflux. La lecture interprétative de l'antibiogramme, le test à l'EDTA, et le Rapidec® Carba NP-test étaient sensibles et spécifiques, comparés à la PCR. Les performances diagnostiques des autres tests étaient médiocres.

Conclusion :

La résistance aux carbapénèmes de *PA* dans cette population était principalement due à des mécanismes non-transférables. La lecture interprétative de l'antibiogramme bien conduite et le test simple à l'EDTA semblent adaptés au dépistage des carbapénémases les plus fréquentes chez *PA*. L'apport diagnostique d'autres tests phénotypiques en pratique courante semble mince.

Mots clés :

Pseudomonas Aeruginosa, carbapénèmes, résistance, réanimation, carbapénémase, test phénotypique

Abréviations :

ATM : AZTREONAM

BGN : bactérie Gram négative

BGP : bactérie Gram positive

BLSE : β-lactamase à spectre étendu

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CAZ : CEFTAZIDIME

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPO : CEFPIROME

DOR : DORIPENEME

EARS-net : European Antibiotic Resistance-network

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEP : CEFEPIME

IMP : IMIPENEME

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight

MBL : Métallo-β-lactamase

MER : MEROPENEME

ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance aux Antibiotiques

PA : *Pseudomonas Aeruginosa*

PAβN : Phénylalanine-Arginine Beta-Naphtylamide

PAVM : Pneumopathie Acquise sous Ventilation Mécanique

PBP : Penicillin Binding Proteins

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique

PIP : PIPERACILLINE

REA-RAISIN : Réanimation - Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

TIC : TICARCILLINE

TCC : TICARCILLINE-Acide Clavulanique

TZP : PIPERACILLINE-TAZOBACTAM

UMP CNRS : Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique

VPN : valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

1. Introduction

1.1. Rappels sur Pseudomonas aeruginosa :

1.1.1 Présentation générale et épidémiologie

Les infections nosocomiales sont une des problématiques majeures de la prise en charge des patients de réanimation, et ont un retentissement important sur la mortalité.

Pseudomonas aeruginosa (*PA*), ou bacille pyocyanique, tire son nom d'une double origine : grecque, pour « *pseudo* » (imitation), et « *monas* » (unité), et latine pour « *aeruginosa* » (vert-de-gris). Il s'agit d'une bactérie Gram négative non fermentante ubiquitaire du genre *Pseudomonas*, aérobie stricte, qui fait partie des principaux germes responsables d'infections nosocomiales en réanimation. 20 sérotypes de PA ont été décrits, individualisés grâce à la structure d'une région polysaccharidique de la membrane externe, dénommée « antigène O ». Les 6 sérotypes les plus fréquents sont responsables de 70% des infections nosocomiales à *PA* (1).

L'incidence de *PA* dans les infections nosocomiales est en augmentation sur les 40 dernières années (2), à hauteur de 17% en Europe de l'Ouest en 2009 (3) et de 14% en France en 2014 (4), faisant de *PA* le germe le plus isolé en réanimation, tous sites confondus.

Bactérie ubiquitaire de l'environnement, *PA* se comporte chez l'animal et chez l'homme comme un commensal opportuniste le plus souvent révélé par la rupture d'une barrière physiologique et/ou la pression de sélection exercée par les antibiotiques, situations communes en réanimation. La contamination se fait donc le plus souvent par voie endogène, via la colonisation des muqueuses intestinale ou pharyngée.

La transmission est soit manuportée, soit via une solution aqueuse ou un équipement contaminé. Les réservoirs de *PA* en milieu hospitalier sont en effet multiples : tuyaux des respirateurs, humidificateurs, nébuliseurs, robinets, siphons, lavabos, douches. (5)

PA présente une virulence importante. L'infection à *PA* est un facteur indépendant de mortalité en réanimation (6). Concernant les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM), le taux de mortalité directement attribuable a été estimé dans certaines cohortes jusqu'à 40% (7) , avec une variabilité selon les sérotypes (8).

La virulence de ce germe et la surmortalité qui en découle peuvent s'expliquer par la présence de multiples facteurs intrinsèques conférant à *PA* une efficacité particulière à toutes les étapes de la colonisation et de l'infection :

- La présence d'un flagelle, favorisant la motilité, ayant un probable rôle dans l'adhésion tissulaire, et dont l'implication dans la virulence est démontrée *in vitro* (9), de même que les pili de type IV, impliqués dans l'adhésion aux muqueuses et dans les déplacements des germes au sein de structures solides, comme les muqueuses (« twitching motility »). L'adhérence aux surfaces inertes (verre, plastique), étant assurée grâce à la présence de facteurs d'attachement de type fimbriae.
- La capacité de PA de synthétiser un exopolysaccharide muqueux (« biofilm »), qui le protège des défenses immunitaires de l'hôte (en particulier dans le cas de la mucoviscidose ou sur matériel), mais aussi de l'action des antiseptiques et des antibiotiques (10)
- La production de toxines et d'enzymes responsables de destructions tissulaires favorisant l'invasion bactérienne (élastase, pyocyanine, exotoxine A) ou perturbant la réponse immunitaire de l'hôte (système T3SS) (11), souvent déjà immunodéprimé

L'expression par la bactérie de ces mécanismes de virulence est régulée, en réponse aux changements de l'environnement, par un système de *Quorum Sensing*, véritable processus de communication intercellulaire via de petites molécules signal, permettant aux bactéries de se coordonner et de synchroniser l'expression globale de ces gènes, rendant l'ensemble de l'inoculum organisé en biofilm comparable à un organisme multicellulaire dans son fonctionnement et son adaptabilité.

Lors de toute infection invasive, le retard à l'initiation d'une antibiothérapie efficace est clairement défini comme facteur pronostique péjoratif indépendant (12). La résistance constitutive du germe incriminé influence donc l'efficacité du traitement. Or, *PA* est un micro-organisme marqué par la présence de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques, constitutionnels et acquis :

1.1.2 Mécanismes de résistance constitutionnels

PA présente une résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques, due à des mécanismes multiples :

- Imperméabilité membranaire (10 à 100 fois supérieure à celle d'*E Coli*), le rendant résistant aux antibiotiques lipophiles (acide fusidique) ou à masse moléculaire élevée, ne pouvant emprunter la voie des porines (pénicillines G, A, M, céphalosporines de 1ère, 2ème, et certaines de 3ème génération, glycopeptides), notamment la porine principale de *PA*, OprF.
- céphalosporinase inductible de type *AmpC*, chromosomique
- pompes d'efflux actif.

En pratique clinique, le phénotype basal de *PA* le rend résistant aux antibiotiques suivants :

- β-lactamines : Pénicillines G, A, M (associées ou non à un inhibiteur de β-lactamase), céphalosporines dites de 1ère, 2ème, et certaines de 3ème génération (CEFOTAXIME, CEFTRIAXONE) : masse moléculaire élevée, hydrolyse par la céphalosporinase chromosomique inductible produite de façon basale par *PA*
- glycopeptides : masse moléculaire élevée
- Rifampicine
- Quinolones de première génération
- Acide fusidique (molécule lipophile)

Une souche de phénotype sauvage de *PA* sera par contre sensible aux antibiotiques suivants :

- β-lactamines :
    - Carboxypénicillines (TICARCILLINE), uréidopénicillines (PIPERACILLINE), avec ou sans inhibiteur de β-lactamase.
    - Céphalosporines : 3ème génération (CEFTAZIDIME), 4ème génération (CEFEPIME, CEFPIROME) La sensibilité à ces molécules est permise par leur relative stabilité face à la céphalosporinase chromosomique inductible produite de façon basale par *PA*.
    - Carbapénèmes (IMIPENEM, MEROPENEM, DORIPENEM), à l'exception notable de l'ERTAPENEM, dont l'efficacité sur *PA* pâtit d'une masse moléculaire et d'une lipophilie plus élevées.(13)
    - Monobactames : AZTREONAM

- Fluoroquinolones : Sensibilité *in vitro* à toutes les fluoroquinolones (CIPROFLOXACINE, OFLOXACINE, LEVOFLOXACINE)
- Aminoglycosides : GENTAMICINE, NETILMICINE, AMIKACINE, TOBRAMYCINE, ISEPAMICINE
- Polymyxines : COLISTINE

Tableau 1 : Profil basal de sensibilité aux antibiotiques de *PA* :

Résistance naturelle	Antibiotiques actifs	
	Liste standard *	Liste complémentaire *
Pénicillines A, G, M Céphalosporines de 1ère et 2ème génération Oxymino-céphalosporines : CEFTRIAXONE, CEFOTAXIME ERTAPENEME Cyclines : TIGECYCLINE Glycopeptides : VANCOMYCINE, TEICOPLANINE RIFAMPICINE Quinolones de 1ère génération Acide fusidique Macrolides CHLORAMPHENICOL	TICARCILLINE PIPERACILLINE TICARCILLINE/acide clavulanique PIPERACILLINE/tazobactam CEFEPIME CEFTAZIDIME AZTREONAM IMIPENEME MEROPENEME Aminosides : GENTAMICINE, TOBRAMICINE, AMIKACINE CIPROFLOXACINE	DORIPENEME NETILMICINE LEVOFLOXACINE Sulfamides FOSFOMYCINE COLISTINE

* Liste d'antibiotiques à tester pour *PA* : recommandations CA-SFM-EUCAST 2014 (14)

1.1.3 Mécanismes de résistance acquise

De plus, *PA* possède un génome étendu et plastique (15), qui lui confère une grande capacité d'adaptation, notamment en termes de résistance aux antibiotiques.

L'accroissement de la multirésistance peut être le fait de l'émergence *de novo* d'une résistance chez des bactéries sensibles, mais le plus souvent elle apparaît sous la pression de

sélection exercée par les antibiotiques. Elle peut résulter aussi de la diffusion de résistance par transmission inter-humaine.

Ces conditions ont conduit à l'émergence de souches ayant acquis de nouvelles résistances aux antibiotiques, notamment aux β-lactamines. Différents mécanismes de résistance acquise de *PA* ont pu être identifiés :

- Non enzymatiques, tels que :

    - l'absence d'expression de gènes codant pour des porines : porines Oprf et OprD2 :

      Ce phénotype est à imputer à la répression de l'expression du gène codant pour la porine OprD, voie d'entrée principale des carbapénèmes dans la bactérie.
      Phénotype à évoquer devant une souche intermédiaire ou résistance à l'IMIPENEME, sans modification de la sensibilité aux autres β-lactamines. Cette résistance spécifique s'explique par le fait que, contrairement aux autres β-lactamines, y compris les autres carbapénèmes, l'IMIPENEME ne peut traverser la membrane externe que par l'intermédiaire de la porine OprD(16,17). Le DORIPENEME et le MEROPENEME apparaissent donc « S », alors que l'IMIPENEME apparaît « I » ou « R ».
      L'altération de la porine D2, mécanisme fréquent chez les souches cliniques (15 à 18% en France), est responsable, si elle est seule, de résistances de bas niveau (CMI à la limite supérieure de la sensibilité). C'est son association (fréquente) dans une même souche avec une céphalosporinase déréprimée et/ou une surexpression de pompes à efflux, qui occasionnera une augmentation des CMI et un profil de résistance vraie.

    - la surexpression de pompes à efflux, via des protéines permettant l'expulsion des molécules nocives pour la bactérie (dont les antibiotiques), et en pratique dépendant de 3 systèmes principaux :

- MexA, MexB, OprM : Mécanisme constitutif, responsable quand il est surexprimé, de la résistance aux carboxypénicillines et aux monobactames. En pratique, la souche apparaîtra le plus souvent intermédiaire ou résistante à la TICARCILLINE et à l'AZTREONAM.

- MexC, MexD, OprJ : Responsable de la résistance au CEFEPIME et au CEFPIROME

- MexE, MexF, OprN : Mécanisme responsable, lorsque associé à la perte de porine D2, d'une résistance à l'IMIPENEME.

- l'altération des sites cibles (protéines de liaison aux pénicillines : PLP). (18–20) : Mécanisme impliqué dans la résistance à la COLISTINE

- Enzymatiques, par production d'enzymes hydrolytiques : Les β-lactamases

Les β-lactamases représentent la première cause de résistance bactérienne aux antibiotiques de la famille des β-lactamines. La classification la plus utilisée pour les catégoriser est la classification d'Ambler (21), qui les divise en 4 classes (A, B, C, ou D), selon leur structure moléculaire :

- Classe A : famille des sérine-β-lactamases
- Classe B : famille des métallo-β-lactamases
- Classe C : famille des céphalosporinases
- Classe D : famille des oxacillinases

Parmi les mécanismes enzymatiques de résistance aux β-lactamines utilisés par *PA*, on retrouve des représentantes de chacune de ces 4 classes.

Une autre classification possible de ces mécanismes acquis décrit leur phénotype, c'est-à-dire leur conséquence sur le profil de sensibilité de la souche, 4 grands tableaux s'individualisent alors :

- Pénicillinases plasmidiques transférables : **PSE**, **TEM**, **OXA** :

De très nombreuses pénicillinases ont été identifiées chez *PA*. La pénicillinase la plus fréquente en France est la carbénicillinase **PSE-1** (classe A de Ambler), suivie par les enzymes de la famille **OXA** à spectre restreint (classe D), ou de la famille **TEM** (**TEM-2**, **TEM-1**) (classe A). Le support génétique de ces enzymes peut être plasmidique ou de localisation chromosomique.

En pratique, la présence d'une pénicillinase se traduira par une résistance à la TICARCILLINE, et dans une moindre mesure à la PIPERACILLINE, avec récupération partielle par les inhibiteurs de β-lactamase (non visible sur l'antibiogramme). La sensibilité aux céphalosporines et aux carbapénèmes sont, elles, conservées.

- Céphalosporinase chromosomique *AmpC* déréprimée (classe C de Ambler)

  Il s'agit du mécanisme de résistance principal de *PA* aux céphalosporines dites « anti-*pseudomonas* ». Sur l'antibiogramme, la dérépression d'*AmpC* (permise, sur le plan moléculaire, par la répression de son inhibiteur, *AmpD*) se traduit par une résistance à toutes les β-lactamines, à l'exception des carbapénèmes, et parfois du CEFEPIME (phénotype S/R), qui résiste mieux à l'hydrolyse que le CEFTAZIDIME (phénotype I/R). Cet aspect de l'antibiogramme ne pourra être observé *qu'en l'absence de coexistence d'autres mécanismes, notamment d'efflux actif*.

  Il est également à noter que de nouvelles céphalosporinases de type *AmpC*, dites « céphalosporinases à spectre étendu », hydrolysant toutes les céphalosporines, voire, dans une certaine mesure, les carbapénèmes, sont décrites désormais chez *PA* (22).

- β-lactamase à spectre élargi (BLSE) :

  Les souches sont résistantes à toutes les β-lactamines à l'exception, en l'absence d'autre mécanisme de résistance associé, des carbapénèmes.

Les BLSE peuvent appartenir à 2 classes différentes de la classification d'Ambler :

Classe A (sérine-β-lactamases) : **TEM**, **SHV**, **PER** (1ère isolée chez *PA* en 1991 (23)), **VEB**, **GES**, **CTX-1**, **CTX-2** :

Les BLSE de classe A ont la particularité d'être inhibées, *in vitro*, par l'acide clavulanique, une synergie peut donc être observée dans certaines cas avec les inhibiteurs de β-lactamase.

Cette synergie ne peut que rarement être mise en évidence d'emblée sur l'antibiogramme, principalement pour les enzymes de type **PER** et **VEB**.

Le test de synergie entre un disque de céphalosporine anti-*PA* et un inhibiteur de β-lactamase permet en théorie de dépister les BLSE de classe A.

Classe D (oxacillinases) : **OXA-1**, **OXA-2**, **OXA-10**

La mise en évidence d'une BLSE de classe D est plus complexe, en l'absence de méthode diagnostique simple en routine. Il s'agit le plus souvent d'un diagnostic d'élimination. En pratique, le profil de résistance inclura, en plus des céphalosporines et des pénicillines, les associations aux inhibiteurs de β-lactamases, seules les carbapénèmes conservent une efficacité.

- carbapénémase

1.1.4 Carbapénèmes et carbapénémases :

- Les carbapénèmes :

Les carbapénèmes sont des antibiotiques de la famille des β-lactamines, dérivés de la thiénamycine, composé isolé pour la première fois en 1976 à partir de *Streptomyces cattleya*

(13). Le premier dérivé semi-synthétique, l'IMIPENEME, a été développé au milieu des années 80.

Une seconde molécule, le MEROPENEME, mise au point au Japon en 1987, et ayant la particularité de ne pas être dégradée par la dihydropeptidase humaine DHP-1 rénale des mammifères, et donc de pouvoir être administrée sans inhibiteur de cette dernière (CILASTATINE), a fait son apparition, d'abord en Amérique du Nord, puis en Europe, dans les années 90.

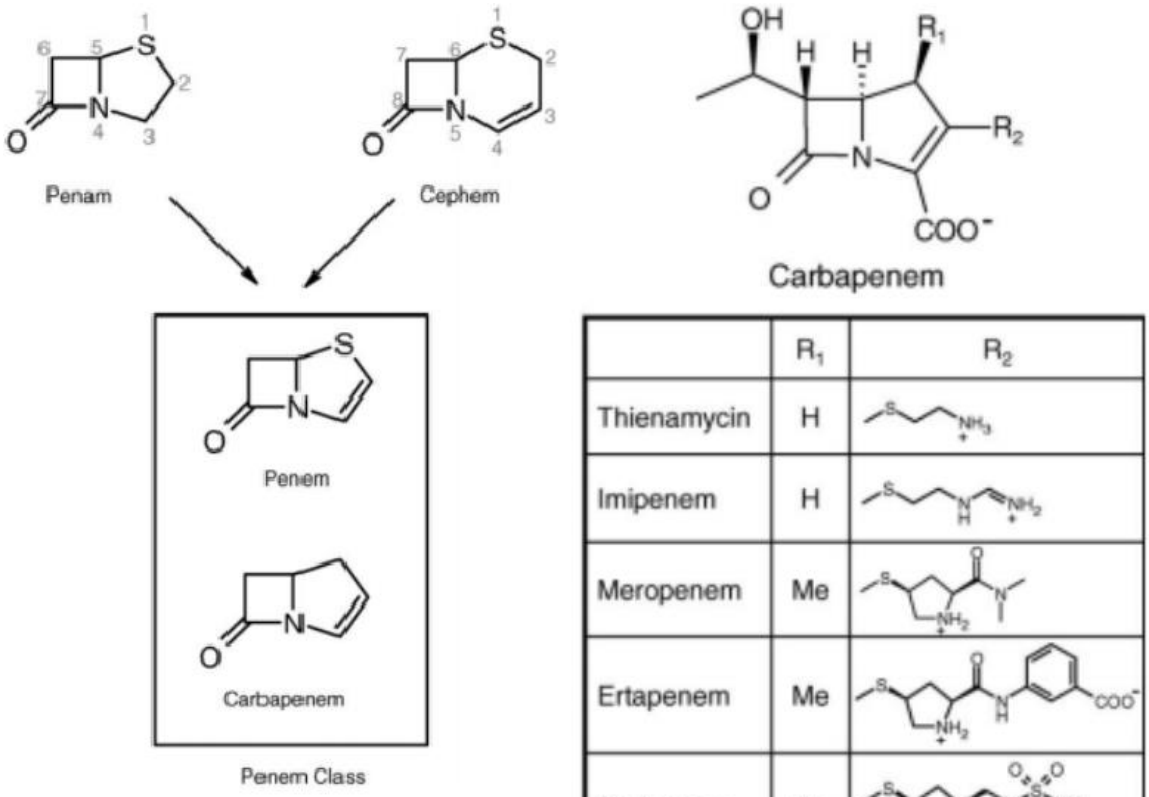
Deux autres molécules apparaissent sur le marché dans les années 2000 : L'ERTAPENEME puis le DORIPENEME (retiré du marché en 2014).

Sur le plan biochimique, les carbapénèmes se distinguent par la présence d'un groupe *penem*, dérivé du groupe *penam* des pénicillines par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un souffre en position 1, et d'une liaison insaturée en C2-C3 (présente également sur le groupe *cephem* des céphalosporines).

La trans-orientation des atomes d'hydrogène en C5 et C6 et la présence d'une chaîne *hydroxyl* en C6, au lieu de la chaîne *acylamino* des pénicillines et des céphalosporines explique leur stabilité face aux β-lactamases, et donc leur large spectre d'activité.

La structure moléculaire du MEROPENEME diffère de l'IMIPENEME par la présence d'un substituant *pyrrolidinyl* en position 2. Cette modification pourrait expliquer l'augmentation de l'activité *in vitro* du MEROPENEME sur les bactéries Gram négatives, dont *PA*, par rapport à l'IMIPENEME(24).

Figure 1 : Structure du noyau *penem* et des carbapénèmes :



	R_1	R_2
Thienamycin	H	
Imipenem	H	
Meropenem	Me	
Ertapenem	Me	
Doripenem	Me	

Zhanel, 2007

Comme les autres β-lactamines, les carbapénèmes inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant aux protéines de liaison aux pénicillines (PBP : Penicillin Binding Proteins), dont l'expression relative des différents sous-groupes PBP1a, PBP1b, PBP2, PBP3, varie entre espèces bactériennes. L'affinité préférentielle du MEROPENEME et du DORIPENEME pour PBP2 et PBP3, particulièrement exprimées par *PA*, et due à leur structure biochimique, pourrait expliquer leur meilleure activité observée *in vitro* contre ce germe, comparativement à l'IMIPENEME (25).

En pratique, le spectre d'activité des carbapénèmes est large, et couvre l'ensemble des bactéries Gram négatives, à l'exception de *Stenotrophomonas maltophilia* (et *PA* et *Acinetobacter Baumannii* pour l'ERTAPENEME), et les bactéries Gram positives, à l'exception

de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, et des entérocoques (Seul l'IMIPENEME conserve une certaine activité vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis*).

En Europe, les carbapénèmes sont réservées à un usage hospitalier, prescrites majoritairement dans le cadre d'infections nosocomiales. La résistance intrinsèque des bacilles Gram négatifs non fermentants, dont *PA*, à de multiples classes d'antibiotiques a pour conséquence l'utilisation fréquente des carbapénèmes pour leur traitement. En France, les services de réanimation sont de loin les plus prescripteurs de carbapénèmes.

La prescription de carbapénèmes en France a augmenté de façon linéaire sur les dernières années (dose délivrée journalière/1000 jours d'hospitalisation +39,5% entre 2009 et 2014) (données REA-RAISIN 2014). Classe antibiotique de 2ème, voire de 3ème ligne, ils représentent souvent une dernière alternative thérapeutique, ce qui rend d'autant plus préoccupante l'émergence de souches de *PA* résistantes aux carbapénèmes.

- Les carbapénémases :

Les carbapénémases font partie de la famille des β-lactamases, et ont pour spécificité d'avoir une activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes.

Des carbapénémases existent à l'état basal chez *Bacillus cereus* (BGP) et *Stenotrophomonas Maltophillia* (BGN), et certaines espèces *d'Aeromonas.* Ces carbapénémases chromosomiques sont rares. L'objet de ce travail concerne les carbapénémases acquises observées chez *PA*.

Il s'agit des β-lactamases les plus versatiles, avec un spectre de résistance sans équivalent parmi les autres enzymes hydrolysant les β-lactamines. En effet, bien qu'étant connues sous le nom de « carbapénémases », ces enzymes, dont l'émergence fait suite à une pression de sélection antibiotique, ont une activité sur toutes les β-lactamines, et la plupart sont résistantes aux inhibiteurs de β-lactamases disponibles sur le marché.

La première β-lactamase acquise avec une capacité d'hydrolyse de l'IMIPENEME (de classe B, **IMP**), a été décrite sur une souche de *Serratia marcescens* au Japon en 1991 (26). Depuis, les descriptions se sont étoffées et l'émergence de ces enzymes chez les entérobactéries et

chez *PA* est décrite de façon croissante dans le monde entier, et constitue un réel problème de santé publique, les carbapénèmes représentant très souvent les dernières molécules actives de l'arsenal thérapeutique (4,19,27).

Parmi les carbapénémases actuellement décrites, on trouve des représentantes de 3 des 4 classes de la classification d'Ambler des β-lactamases (28):

- Classe A : famille des sérine-β-lactamases

- **KPC** (*Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase) :

  Les premières carbapénémases de cette classe ont été décrites sur des souches de *Klebsiella Pneumoniae,* sur la côte Est des Etats-Unis en 1996 (29), avant d'être identifiées dans tous les états du pays, puis en Grèce et au Moyen-Orient, où elles semblent aujourd'hui endémiques (30). La première souche de *PA* dotée de cette enzyme a été décrite en Colombie en 2006 (31). Bien que peu représentée chez PA par rapport aux autres types de carbapénémases, son incidence est en augmentation en Amérique et dans les Caraïbes.

- 3 enzymes de la famille **GES** (β-lactamases de type A connues initialement pour une activité BLSE), ont été identifiées comme ayant une activité carbapénémase (bien que faible) sur des souches de *PA* : **GES-2**, **GES-5**, **GES-18** (32)

Le support génétique de ces enzymes peut être chromosomique comme plasmidique.

Les carbapénémases de classe A ont pour particularité d'être totalement ou partiellement inhibées, *in vitro*, par l'acide boronique et les inhibiteurs classiques de β-lactamases que sont l'acide clavulanique et le TAZOBACTAM.

- Classe B : famille des métallo-β-lactamases

Les carbapénémases les plus répandues et les plus significatives chez *PA* sont des métallo-β-lactamases (activité dépendante de la présence d'un cation divalent, le zinc pour la plupart). Sept groupes ont été décrits chez *PA* :

- **IMP** (active on IMIPENEM) :

  Famille subdivisée elle-même en 51 sous-groupes, dont 32 décrits chez *PA*, et ayant une activité hydrolytique *in vitro* similaire
- **VIM** (Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase) :

  Première métallo- β-lactamase décrite chez *PA*, en 1997 (33), endémique en Italie et en Grèce.

  23 variantes ont été identifiées chez *PA*
- **SPM** (Sao Paulo Metallo-β-lactamase)
- **AIM** (Australia imipenemase)
- **GIM** (German imipenemase)
- **DIM** (Dutch imipenemase)
- **NDM-1** (New Delhi Metallo-β-lactamase) :

  Mise en évidence initialement en 2008 sur des entérobactéries en Inde (34), la première description chez *PA* date de 2011 (35).

Le support génétique de ce type de carbapénémases est le plus souvent plasmidique, et associé au sein d'intégrons et de transposons, qui assurent la mobilité de ces gènes, et donc la transmission horizontale entre bactéries d'espèces différentes.

Les carbapénémases de classe B ont la particularité d'être résistantes aux inhibiteurs de β-lactamases, mais de voir leur activité inhibée par les chélateurs d'ions zinc que sont l'EDTA et l'acide dipicolinique.

L'activité hydrolytique de cette famille de carbapénémase est effective sur l'ensemble des β-lactamines, à l'exception notable de l'AZTREONAM, avec une activité parfois moins marquée sur la PIPERACILLINE. Insistons sur le fait que ce profil à l'antibiogramme n'a cours qu'en l'absence d'autre mécanisme associé de résistance, enzymatique ou non, situation rare en pratique clinique.

- Classe C : famille des céphalosporinases

L'exposition aux β-lactamines, dont les carbapénèmes, a pour conséquence l'induction de l'hyperexpression du gène de la céphalosporinase chromosomique *AmpC* de *PA*.

Récemment, ont été observées des souches de *PA* productrices d'une céphalosporinase *AmpC* chromosomique mutante (résidu Alanine en position 105), ayant une activité hydrolytique *in vitro* sur l'IMIPENEME (22).

Cependant, la significativité clinique de cette découverte reste à évaluer.

- Classe D : famille des oxacillinases

Deux représentantes des β-lactamases de classe D à activité carbapénémase ont été décrites chez *PA* :

- **OXA-40** : Mise en évidence sur une souche espagnole en 2006, de support plasmidique, et plus répandue chez *Acinetobacter Baumannii* (36)
- **OXA-198** : Isolée en Belgique en 2011, de support plasmidique (37)

Les carbapénémases de classe D ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, mais exercent une plus faible activité hydrolytique envers les céphalosporines, comparativement aux autres β-lactamines. Celles-ci apparaissent donc relativement « épargnées » à l'antibiogramme.

Tableau 2 : Phénotypes de résistance en fonction des mécanismes de résistance :

Antibiotique / Mécanisme de résistance	**TIC**	**TCC**	**PIP**	**TZP**	**CAZ**	**CPO**	**FEP**	**ATM**	**MER/ DOR**	**IMP**
Phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Perte de porine OprD	S	S	S	S	S	S	S	S	S/I	I /R
Efflux surexprimé (MexA/B, OprM)	R	R	s	s	s	s	s	R	S/I	S
Efflux surexprimé (MexC/D, OprJ)	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Efflux surexprimé (MexE/F, OprN) + perte de porine OprD	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Pénicillinase plasmidique	R	I/R	I/R	S/I	S	S	S	S	S	S
AmpC hyperproduite	R	R	R	R	R	S/R	S/R	R	S	S
BLSE de classe A	R	S/R	R	S/R	R	R	R	R	S	S
BLSE de classe D	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Carbapénémase de classe A	R	S/I	R	S/I	R	R	R	R	I/R	I/R
Métallo-carbapénémase	R	R	I/R	I/R	R	R	R	S	I/R	I/R
Carbapénémase de classe D	R	R	R	R	I/R	I/R	I/R	S	I/R	I/R
BLSE de classe D + perte de porine OprD	R	R	R	R	R	R	R	R	S/I	I/R

S : sensible, I : intermédiaire, R : résistant, s : sensibilité diminuée

Tableau 3 : Classification des β-lactamases inductibles de *PA*, en fonction de leur classe d'Ambler :

Classe d'Ambler / β-lactamases décrites chez *PA*	**A** sérine-β-lactamases	**B** métallo-β-lactamases	**C** Céphalosporinases	**D** Oxacillinases
Pénicillinase †	**PSE-1**, **PSE-2** **TEM-1**, **TEM-2**			Oxacillinases à spectre restreint (**OXA-1**, **OXA-2**)
BLSE *†	**TEM**, **SHV**, **PER**, **VEB**, **GES**, **CTX-1**, **CTX-2**			**OXA-1**, **OXA-2**, **OXA-10**, **OXA-18**
AmpC *			*AmpC*	
Carbapénémase *†	**GES-2**, **5**, **18**, **KPC**	**IMP**, **VIM**, **SPM**, **AIM**, **GIM**, **DIM**, **NDM**	« céphalosporinases à spectre étendu »	**OXA-40, OXA-198** **OXA-48 ?**

* Support chromosomique

† Support plasmidique (transférable)

1.1.5 Epidémiologie de la résistance de *PA* aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance de *PA* aux β-lactamines sont multiples et coexistent souvent sur une même souche, rendant possible l'émergence de souches de *PA* dites « multirésistantes ». Cette « multirésistance », bien que n'ayant pas été définie de façon formelle dans la littérature (38), désigne le plus souvent des souches résistantes à plusieurs classes thérapeutiques, dont les fluoroquinolones et les carbapénèmes.

Chez les entérobactéries comme chez *PA*, un lien a été mis en évidence entre la présence d'une carbapénémase et la résistance de la même souche à de multiples classes d'antibiotiques, comme les aminosides, les fluoroquinolones, les tétracyclines. Cette

multirésistance s'explique, d'une part par les mécanismes non-enzymatiques de résistance précédemment décrits, qui touchent simultanément plusieurs classes antibiotiques, mais aussi par la coexistence de différents gènes de résistance chez ces mêmes germes, déjà soumis à une pression antibiotique antérieure (39–41). La présence sur une souche d'une carbapénémase devra donc faire suspecter et rechercher des résistances acquises associées à des antibiotiques d'autres classes que les β-lactamines.

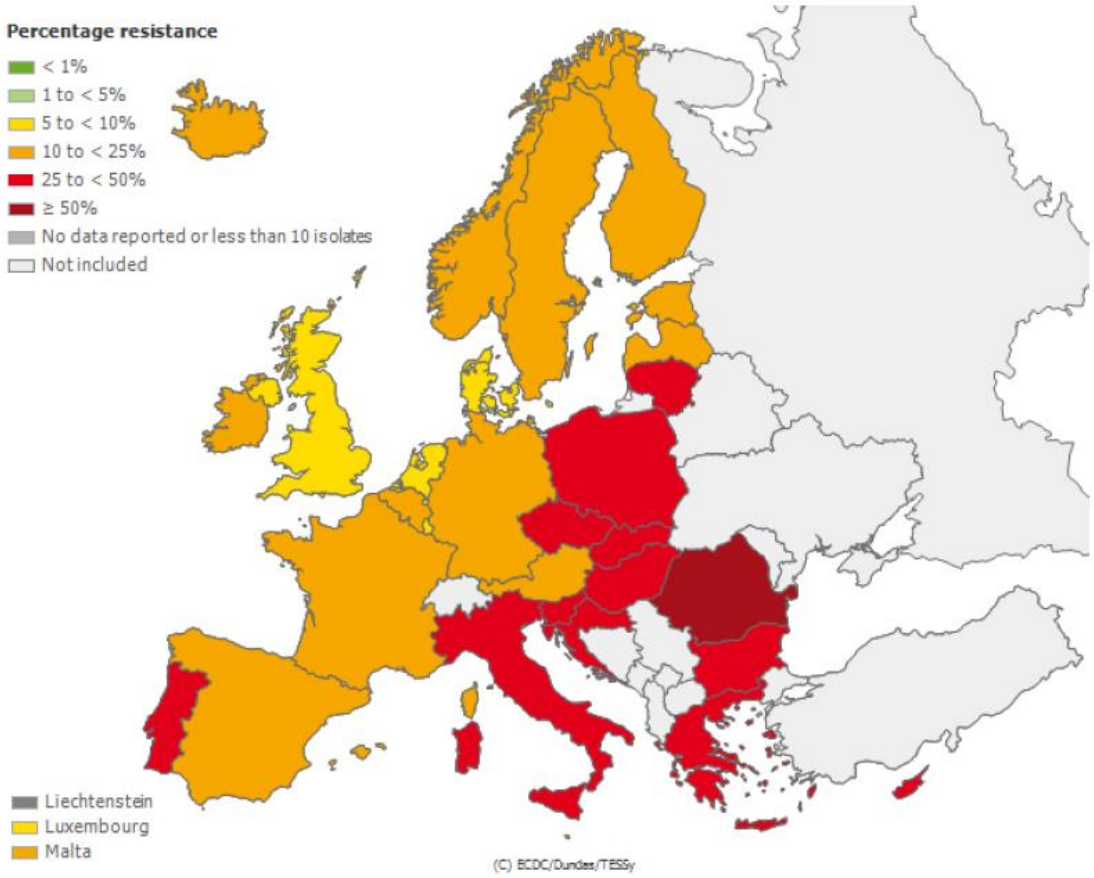
L'incidence de ces souches multirésistantes est en augmentation à l'échelle mondiale (18,19,42), et est une source de préoccupation majeure (27). En dehors des pics épidémiques, survenant ponctuellement dans des hôpitaux et des régions sanitaires, qui sont autant de témoins de la rapidité de la transmission horizontale des nouveaux gènes de résistance, le taux global de résistance de *PA* aux antibiotiques est désormais surveillé de près par les organismes de veille sanitaire.

A l'échelle européenne et française, après une dynamique similaire, la tendance inverse s'observe sur les dernières années, avec un taux de résistance de *PA* à la CEFTAZIDIME passant en France de 26,2% à 17,1% entre 2004 et 2014, et un taux de résistance à l'IMIPENEME passant de 23,4% à 19,7% entre 2012 et 2014 (4), plaçant la France au 14ème rang européen en terme de pourcentage de souches de *PA* intermédiaires ou résistantes aux carbapénèmes. Les foyers d'endémie de *PA* « multirésistants » précédemment décrits s'observent toujours, avec des taux respectifs de résistance de *PA* aux carbapénèmes de 58,5%, 42,9%, 35,3% pour la Roumanie, la Grèce, et la Croatie (données EARS-Network 2014).

A l'échelle nationale, il existe des disparités concernant la sensibilité de *PA* en fonction de paramètres cliniques ou démographiques. En effet, des données récentes de l'ONERBA pour l'Ile de France en 2013 concernant les souches de *PA* responsables de bactériémies montrent des taux de résistance légèrement plus élevés (21,8% de résistance à l'IMIPENEME) (43). A l'inverse, les données de l'ONERBA pour la région Nord-Pas-de-Calais semblent rapporter une incidence plus faible de *PA* multirésistants (8% en 2013).

A l'échelle d'un même service, le lien entre prescription de carbapénèmes et taux de résistance de *PA* aux carbapénèmes est également démontré (44).

Figure 1 : Taux de résistance de PA aux carbapénèmes (souches « I » ou « R ») par pays de l'Union Européenne (2014)



Données EARS-Net 2014

Figure 2 : Evolution de la résistance de PA aux antibiotiques en France de 2000 à 2013

Tableau 2.38 - *Pseudomonas aeruginosa* : évolution de la sensibilité (%) aux antibiotiques.
Table 2.38 - Pseudomonas aeruginosa: evolution of the susceptibility (%) to antibiotics (réseau REUSSIR, 2000 - 2013)

Antibiotique / *Antibiotic*	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
(Nombre de souches / *N strains*)	N=1917	N=1989	N=2361	N=5768	N=6287		N=6139	N=6899	N=5348	N=5688	N=5781	N=6405	N=4814	N= 5975
Ticarcilline	63	61	65	58	60	-	61	63	61	60	59	62	58	60
Pipéracilline	78	76	79	80	79	-	80	81	79	80	79	81	81	81
Ceftazidime	85	85	86	84	83	-	86	85	86	88	87	88	88	87
Imipénème	85	85	83	81	82	-	84	85	84	85	83	83	81	80
Gentamicine	45	47	50	64	68	-	70	75	80	81	80	82	77	81
Tobramycine	74	74	77	82	83	-	83	85	86	85	85	86	84	87
Amikacine	79	79	84	83	85	-	83	83	87	89	87	88	87	87
Fluoroquinolones	70	67	69	70	71	-	69	74	73	71	71	72	70	73

- : non disponible / *not available*

Source : ONERBA 2013

En 2004, l'analyse des souches provenant de 15 centres hospitalo-universitaires français a montré un taux de sensibilité de *PA* de 62% pour la TICARCILLINE, de 78% pour la PIPERACILLINE, de 78% pour la CEFTAZIDIME, de 83% pour l'IMIPENEME et de 68% pour la CIPROFLOXACINE (45).

Dans une étude multicentrique française de 2013 comparant 204 souches de *PA* prélevées chez des patients atteints de mucoviscidose, 40% avaient un profil de résistance non basal. La répartition de ces mécanismes de résistance acquise était la suivante : dérépression de la céphalosporinase de type AmpC 61%, acquisition de nouvelle β-lactamase 14%, hyperexpression de pompes d'efflux 89%, perte de porine 54%, ces résultats mettant en lumière la *coexistence fréquente* de plusieurs mécanismes acquis chez une même souche. En 2007, Hocquet *et al.* ont ainsi montré l'accumulation de 7 de ces mécanismes sur une même souche, sans que celle-ci ne s'accompagne d'une diminution de la virulence de la souche (46). Autre témoin de l'accumulation chez une même souche de mécanismes multiples, Castanheira *et al*. ont montré en 2013, dans une étude multicentrique sur 14 pays européens évaluant des souches cliniques de PA résistantes au DORIPENEME, 94,9% de perte de porines

D2, 44,4% d'AmpC hyperproduite, 25,6% de métallo- β-lactamases (souches provenant de zones d'endémie), et 20,1% de mécanismes d'efflux (47).

Il est à noter que la multirésistance de *PA* semble surreprésentée dans les services de réanimation : Taux d'incidence des souches multirésistantes de 14,5/1000 séjours (contre incidence globale de 1,24/1000 hospitalisations) en 2013 (Données ONERBA), taux de sensibilité des souches à la TICARCILLINE significativement plus bas que pour les autres services (réseau REUSSIR 2013).

Des études rétrospectives ont cherché à mettre en évidence des facteurs de risque d'infection à *PA* résistant aux carbapénèmes en réanimation (48–50) :

L'exposition préalable aux carbapénèmes ou aux céphalosporines à large spectre, un séjour préalable en réanimation, la durée de séjour en réanimation, et la présence de dispositifs invasifs (sonde urinaire) semblent ressortir comme facteurs associés à la multirésistance. A l'échelle d'un même centre, une corrélation étroite semble s'observer entre la consommation de carbapénèmes et la résistance des souches de PA aux carbapénèmes (51).

1.1.6 Multirésistance et pronostic

Il a été observé, chez les entérobactéries, au sein même de la sous-population des germes producteurs de **KPC**, une différence de virulence entre deux sous-types de carbapénémases de type **KPC** (*bla*$_{KPC-2}$ et *bla*$_{KPC-3}$), avec notamment, l'association pour l'un des deux sous-groupes à la résistance aux aminosides (52). Cette constatation appuie le fait que la présence d'une résistance acquise enzymatique, qui plus est de spectre étendu, est un facteur de virulence propre pour le germe.

L'hospitalisation en réanimation fait partie des facteurs de risques suspectés de développer une infection à *PA* multirésistant, et cette multirésistance a été montrée comme associée à un moins bon pronostic (augmentation de la mortalité, de la durée de séjour, du risque de bactériémie secondaire, dégradation des scores fonctionnels à long terme) (49).

L'émergence de la multirésistance de *PA* est responsable directement de 440 décès par an aux Etats-Unis (27).

Deux études récentes, portant sur plusieurs centaines de patients, ont montré que les infections à *PA* producteurs de métallo-β-lactamases étaient associées à un taux de mortalité plus élevé que celles dues à une souche sauvage (17,3/1000 *vs* 11,8/1000, RR 1,55, IC 95% : 1,06-2,27), et que la résistance à l'IMIPENEME était un facteur indépendamment associé à une surmortalité (31,1% *vs* 16,7%, RR : 1,86, IC 95% : 1,38-2,51)(53,54).

Sur le plan médico-économique, l'impact péjoratif de la majoration des coûts d'hospitalisation liée directement à la multirésistance est bien démontré, aussi bien pour les entérobactéries (55), que pour *PA* (56).

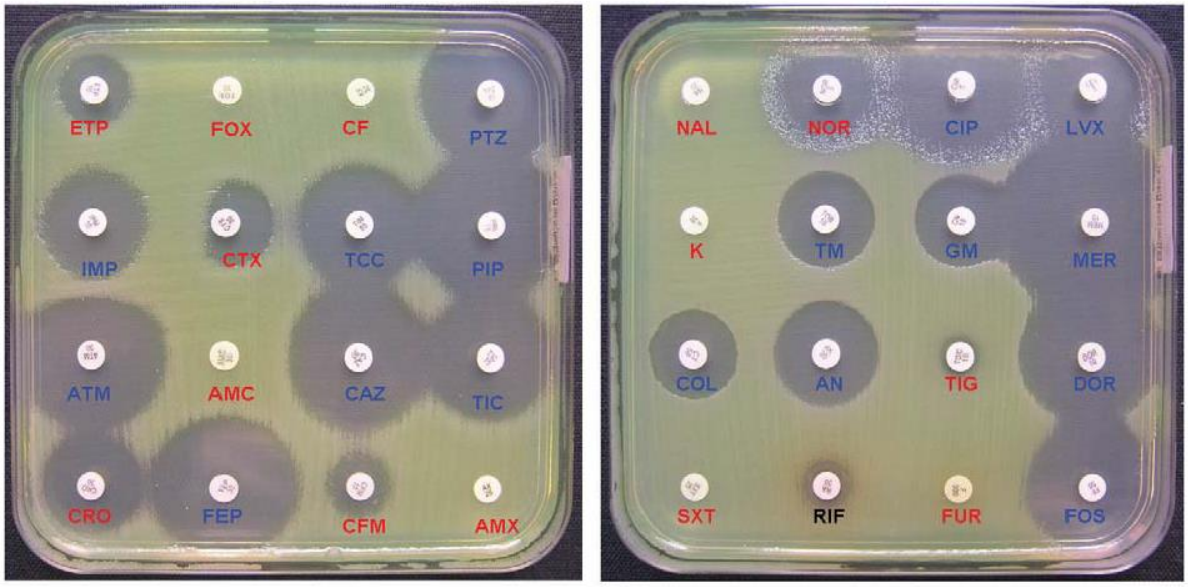
1.1.7 Lecture interprétative de l'antibiogramme :

Le but de l'antibiogramme est de dépister les résistances acquises. *PA* étant une espèce spontanément résistante à de nombreux antibiotiques, les molécules d'intérêt à tester sur une souche de *PA* sont donc encadrées par des recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM), en accord avec l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (**Tableau 1**) (14):

L'antibiogramme permet de classer, par la méthode des disques d'inhibition, par diffusion en milieu gélosé (gélose de Mueller-Hinton (MH)), la souche comme sensible (S), intermédiaire (I), ou résistante (R) à chaque molécule, selon les diamètres critiques, après incubation à 35±2ºC, pendant 20±4 heures.

Figure 3 : Antibiogramme d'une souche de *PA* de profil sauvage (souche de contrôle ATCC 27853):

(Choix des disques plus large que ceux recommandés par le CA-SFM)



Mérens, 2012

La lecture interprétative de l'antibiogramme permet au bactériologiste clinicien de suspecter, en fonction du phénotype observé, des mécanismes principaux de résistance (tableau 3), qui seront confirmés ou infirmés par des tests supplémentaires, ainsi par exemple :

- Une résistance isolée à l'IMIPENEME fera suspecter la présence d'une perte de porine D2. L'évaluation quantitative du diamètre d'inhibition fera suspecter la présence d'un autre mécanisme associé.
- Une diminution de sensibilité isolée à la TICARCILLINE ou à l'AZTREONAM fera suspecter la présence d'un système d'efflux de type MexA-B-OprM. Une différence de diamètre de 4 mm entre le disque d'AZTREONAM et de CEFTAZIDIME a été proposée comme critère diagnostique. Ce mécanisme pourra aussi être suspecté en cas de résistance isolée (et de faible niveau) aux fluoroquinolones et à un carbapénème, sans atteinte des autres molécules de la classe.

- La présence d'une pénicillinase sera suspectée en cas de résistance isolée à la TICARCILLINE, voire de moindre niveau à la PIPERACILLINE
- La présence d'une céphalosporinase *AmpC* déréprimée (mécanisme de résistance principal de *PA* aux céphalosporines anti-*pseudomonas*) se traduira par une résistance à toutes les β-lactamines, y compris la CEFTAZIDIME. Un diamètre d'inhibition à l'AZTREONAM supérieur à celui de la CEFTAZIDIME, associé à un diamètre d'inhibition à la TICARCILLINE supérieur à celui de la PIPERACILLINE sera un profil fortement évocateur.

  L'absence de synergie avec les inhibiteurs de β-lactamase comme l'acide clavulanique permettra parfois de différencier ce profil d'une activité BLSE.
- Une souche montrant d'emblée une résistance à l'ensemble des β-lactamines, y compris les carbapénèmes, sera suspecte de carbapénémase. Le fait que la sensibilité à l'AZTREONAM soit épargnée est un élément d'orientation vers une métallo-carbapénémase.

La lecture interprétative peut être réalisée par des systèmes automatisés, mais cette technique semble montrer des limites, notamment concernant *PA*, et ne remplace pas l'interprétation du bactériologiste clinicien (57).

Une limitation majeure de cette technique, en plus du niveau d'expertise requis pour une telle interprétation, est son efficacité limitée en cas de coexistence de plusieurs mécanismes de résistance sur une même souche, situation très fréquente. Il est alors nécessaire de faire appel à des tests complémentaires, afin de permettre au clinicien de dépister précocement les souches productrices de BLSE ou de carbapénémase, présentant un risque épidémique immédiat.

1.2. Tests des mécanismes de résistance aux carbapénèmes :

En cas de suspicion à la lecture de l'antibiogramme de présence d'un de ces mécanismes de résistance, ou de toute diminution de sensibilité aux carbapénèmes, intrinsèquement suspecte, des explorations complémentaires doivent être menées. Différents tests ont été développés, dans le but de décrire précisément les mécanismes expliquant le phénotype de résistance d'une souche.

1.2.1 Phénotypiques

- **Tests d'inhibition « simples » :**

- Test d'inhibition par la CLOXACILLINE :

La CLOXACILLINE est, à fortes doses, un inhibiteur des céphalosporinases (β-lactamases de classe C). Elle peut être utilisée pour dépister la présence d'une *AmpC* déréprimée. La réalisation d'un antibiogramme sur un milieu gélosé imprégné de CLOXACILLINE (500 ou 1000 µg/mL) permet de détecter les souches productrices, et de s'affranchir de ce mécanisme en cas de phénotype de résistance complexe.

L'activité hydrolytique de la céphalosporinase de type *AmpC* de *PA* étant maximale sur l'IMIPENEME par rapport au MEROPENEME et au DORIPENEME (58), c'est sur cette molécule que l'effet est le plus attendu.

- Test de synergie entre l'acide clavulanique et la CEFTAZIDIME : recherche de BLSE

Très souvent en présence d'une BLSE, la synergie avec les inhibiteurs de β-lactamase ne s'observe que rarement sur l'antibiogramme standard. La réalisation d'un test de synergie entre un disque de CEFTAZIDIME et un disque contenant de l'acide clavulanique, donnant un aspect dit de « bouchon de champagne », permet de sensibiliser la détection de BLSE de classe A (La synergie n'étant que peu observée pour les BLSE de classe D, leur identification nécessite d'autres méthodes diagnostiques).

La réalisation de ce test sur milieu contenant de la CLOXACILLINE permet de s'affranchir de l'activité confondante d'une éventuelle *AmpC* hyperproduite.

Figure 4 : Test de dépistage de BLSE positif (synergie CEFTAZIDIME-acide clavulanique) : souche 17 :



- <u>Test d'inhibition par l'EDTA :</u>

L'Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), est un chélateur d'ions zinc, inhibiteur des métallo-enzymes, qui représentent la classe de carbapénémases la plus répandue chez *PA*. La comparaison des diamètres d'inhibition entre des disques d'antibiotiques avec et sans EDTA constitue un moyen de dépistage de ces métallo-carbapénémases. La sensibilisation par l'EDTA peut également être utilisée dans le cadre de mesure de la CMI par bandelette E-test®.

En utilisant la méthode des disques d'inhibition, Pitout *et al*. ont montré une bonne sensibilité et une bonne spécificité de ce test avec pour seuil de positivité une augmentation de diamètre pour l'IMIPENEME et/ou pour le MEROPENEME supérieure ou égale à 7 mm (59).

D'autres inhibiteurs des métallo-β-lactamases comme l'acide dipicolinique, l'acide mercaptopropionique, l'acide mercaptoacétique, le mercaptoéthanol peuvent également être utilisés (60).

- Test d'inhibition par l'acide boronique :

L'acide boronique est un inhibiteur des β-lactamases de classe A, mais exerce également une activité inhibitrice sur les céphalosporinases de type *AmpC*. Associé à la sensibilisation par la CLOXACILLINE, il pourrait permettre de dépister les carbapénémases de classe A.

- Test d'inhibition de l'efflux :

La Phénylalanine-Arginine Beta-Naphtylamide (PAβN), est un inhibiteur dose-dépendant bien étudié des pompes d'efflux actif de la paroi externe des bactéries Gram-négatives (61), il semble discriminant pour dépister les souches hyperproductrices d'efflux en comparant les CMI entre géloses sans et avec PAβN à la concentration de 50 µg/mL (62).

- **Tests combinés :**

Devant les limites des méthodes phénotypiques simples, différents tests combinés, mélangeant les inhibiteurs, ont été commercialisés, proposant des algorithmes diagnostiques permettant d'inférer le mécanisme de résistance d'une souche.

- **Tests enzymatiques :**

Différant des tests combinés utilisant des inhibiteurs, le Carba NP test®, commercialisé en 2012, est basé sur la détection biochimique de l'hydrolyse du noyau β-lactam de l'IMIPENEME (témoin de la présence d'une activité carbapénémase), révélée par une variation de pH induisant un changement de couleur. Il permet un diagnostic rapide (environ 1 heure)(63,64) de l'ensemble des carbapénémases.

1.2.2 Génotypiques :

Ces méthodes représentent le *Gold Standard* actuel pour le diagnostic des carbapénémases connues.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de réplication ciblée *in vitro* permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique (les amorces prédéfinies bornant la séquence à amplifier), révélé après migration sur un gel d'électrophorèse. Elle constitue la méthode de référence utilisée pour confirmer la présence d'un gène de carbapénémase sur une souche. Dans sa version dite « multiplex » (utilisation concomitante de plusieurs amorces), elle permet de rechercher plusieurs de ces gènes sur un même gel.

La limite de la PCR, outre son coût, l'expertise nécessaire à sa réalisation, et le délai avant obtention des résultats (24 à 48 heures), réside principalement dans le fait qu'elle ne permet de mettre en évidence que des séquences géniques déjà connues, or de nouvelles carbapénémases sont régulièrement découvertes, et de multiples variations alléliques sont décrites pour chacune.

De multiples méthodes diagnostiques génotypiques dérivées de la PCR et ayant pour but d'augmenter la sensibilité de détection, et la vitesse d'obtention des résultats, ont été développées.

Une autre technique génotypique, plus ancienne, le test d'hybridation, ou Southern Blot, peut permettre ce dépistage. Après section de l'ADN bactérien total par une enzyme de restriction, et migration sur un gel d'électrophorèse, un transfert sur feuille de nylon des fragments de restriction obtenus est réalisé par capillarité. Une hybridation est alors possible avec une sonde marquée complémentaire du fragment d'ADN recherché, et révélée (65). Cette technique permet également, via les marqueurs de taille, de localiser le support génétique du gène, et d'affirmer sa fréquente localisation plasmidique. L'intérêt relatif de cette technique par rapport à la PCR réside dans sa plus grande sensibilité. Elle n'est en effet que peu impactée par les mutations ponctuelles survenant sur les promoteurs des gènes de carbapénémases.

1.3. Enjeux du diagnostic rapide

En pratique clinique, et particulièrement en service de réanimation où les souches multirésistantes sont sur-représentées, la recherche de carbapénémase peut avoir lieu dans deux situations :

- Le dépistage, chez un patient à risque : antécédent d'exposition ou provenance d'une zone d'endémie
- La suspicion clinique, devant une souche responsable d'une infection, et dont le profil de l'antibiogramme montre une sensibilité diminuée à une ou plusieurs carbapénèmes.

Dans ces 2 cas, la mise en évidence d'une carbapénémase a deux conséquences immédiates sur la prise en charge :

- A l'échelle individuelle : l'optimisation de la stratégie antibiotique
- A l'échelle du service : Prévention des épidémies

1.3.1. A l'échelle individuelle : optimisation de la stratégie antibiotique :

La résistance naturelle de *PA*, et la multiplicité des mécanismes de résistance acquis sont responsables d'inadéquations thérapeutiques, grevant le pronostic d'infections le plus souvent sévères. En outre, les souches productrices de carbapénémases ont un profil multirésistant, la sensibilité aux autres classes antibiotiques étant souvent affectée. La mise en évidence d'une carbapénémase doit donc faire suspecter des résistances associées aux autres classes d'antibiotiques, notamment aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides. L'intérêt de définir au plus vite une stratégie antibiotique efficace sur ces souches est donc majeu**r**.

- Dans la situation d'une infection à souche résistante à un ou plusieurs carbapénèmes alors que plusieurs autres antibiotiques sont encore actifs, le choix de l'antibiothérapie sera guidé par la CMI, l'urgence ne pouvant attendre les résultats de l'étude phénotypique (et encore moins génotypique) précise du mécanisme de résistance.

- Dans la situation d'une infection à souche multirésistante, voir toto résistante, y compris aux carbapénèmes, l'exploitation des sensibilités collatérales est une réponse possible (66). Cette stratégie réside sur le choix d'une thérapie anti-infectieuse ciblée par les résultats de l'antibiogramme sur plusieurs classes d'anti-infectieux : Certaines associations synergiques, pouvant faire appel à des molécules auxquelles *PA* est résistant en monothérapie comme la RIFAMPICINE ou la VANCOMYCINE, peuvent nécessiter une connaissance du mécanisme de résistance (61,67), d'où l'intérêt potentiel dans ces situations, de tests complémentaires.

A l'échelle individuelle, en dehors de ces situations de multi- ou toto-résistance, les tests phénotypiques n'ont donc qu'une place limitée.

1.3.2. A l'échelle du service : Prévention des épidémies :

- Mesures d'isolement et d'hygiène
- Recherche de la souche de contamination
- Dépistage des patients de l'unité

Les mécanismes de résistance non-enzymatiques, issus d'une réaction intrinsèque de la bactérie à un stimulus extérieur (la pression antibiotique), ont un support génétique chromosomique, présent à l'état basal sur la bactérie. Ce trait de résistance aux carbapénèmes n'est donc pas transférable à d'autres bactéries, à contrario de la plupart des gènes des carbapénémases, et donc non justiciable de procédures d'isolement particulières.

L'hyperexpression d'*AmpC*, de support chromosomique, et présente à l'état basal chez *PA*, responsable, lorsqu'elle est associée à un mécanisme d'efflux ou d'imperméabilité, de résistance aux carbapénèmes, rentre dans cette première catégorie, bien que représentant un mécanisme enzymatique de résistance.

La découverte de nouvelles carbapénémases se fait le plus souvent à l'occasion d'un pic épidémique, témoin de la forte transmissibilité horizontale de ces gènes, et de la nécessité d'adopter des mesures rapides et efficaces pour la prévenir.

Témoin de l'importance de la problématique posée par la diffusion des carbapénémases à l'échelle nationale, la circulaire N°DGS/RI/DGOS/PF/2010/413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesure de contrôles des cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénémases, du Ministère de la Santé, stipule que « toute diminution de la sensibilité aux carbapénèmes sur l'antibiogramme doit conduire à une analyse moléculaire de la résistance ». Il n'existe pas à ce jour de texte similaire concernant *PA*.

L'absence de recommandations à l'heure actuelle peut s'expliquer de plusieurs façons : Tout d'abord, la structure même de *PA*, lui permettant de développer des mécanismes de résistance intrinsèques à l'ensemble des classes thérapeutiques, rend l'acquisition d'enzymes hydrolytiques non nécessaire à sa résistance, y-compris aux carbapénèmes. D'autre part, *PA* ne constitue pas, à l'inverse des entérobactéries, une part importante du microbiote intestinal. Son implication dans le portage chronique de germes multirésistants est donc probablement moindre. Enfin, le comportement *in vitro* de *PA* est différent de celui des entérobactéries, et l'inhibition de l'action des carbapénémases est plus difficile à mettre en évidence chez *PA*, en partie du fait de sa faible perméabilité membranaire constitutive, et de la fréquence d'autres modes de résistance aux carbapénèmes.

Il est donc important pour le clinicien, pour le microbiologiste, et pour le médecin hygiéniste, de connaître les forces et les limites des différentes méthodes de détection disponibles, afin de déterminer la stratégie à adopter pour dépister efficacement les germes multirésistants.

1.4 Rationnel et objectifs de l'étude :

De nombreuses études ont cherché à évaluer la fiabilité de ces différents tests sur l'ensemble des bactéries Gram négatives (68), ou spécifiquement sur les entérobactéries, espèce la première concernée par l'émergence de carbapénémases, mais dont le profil basal de résistance et le comportement *in vitro* sont différents de *PA*.

De plus, un grand nombre de ces études a inclus des souches présélectionnées, génotypées, pour lesquelles la présence d'une carbapénémase était connue *a priori*, ce qui ne correspond pas à la situation réelle.

Notre objectif principal a été d'évaluer la qualité et l'apport diagnostiques d'un ensemble de tests phénotypiques de recherche de carbapénémase sur des souches de *PA*. Nous avons donc voulu nous placer du point de vue du clinicien non expert, et tester des souches cliniques, dont l'antibiogramme standard mettait en évidence une diminution de sensibilité aux carbapénèmes, afin de confronter les résultats de ces tests aux résultats de l'analyse génotypique.

Nos objectifs secondaires étaient les suivants :

- avoir un aperçu épidémiologique de la part respective des différents mécanismes de résistance aux carbapénèmes sur une population multicentrique de souches cliniques de *PA* de réanimation en France
- évaluer les performances diagnostiques de ces tests, en incluant dans l'analyse des témoins positifs.
- évaluer les performances de tests diagnostiques phénotypiques des autres mécanismes de résistance chez *PA* (BLSE)

2. Matériel/Méthode

2.1 Organisation de la recherche :

Les manipulations et les tests phénotypiques et génotypiques de confirmation ont été réalisés dans le laboratoire Aquitaine Microbiologie de l'Université de Bordeaux (UM CNRS 5234), dirigé par le Dr M'Zali, avec l'aide d'Audrey Payet, ingénieure en microbiologie. Il m'a été offert l'opportunité de réaliser moi-même une partie des manipulations par le Pr Boyer et le Pr Gruson, du service de réanimation médicale du CHU de Bordeaux (service du Pr Hilbert).

Les premières étapes d'isolement des souches, d'identification et de sélection, d'exclusion des souches redondantes avaient été réalisées dans le cadre d'un projet précédent s'intéressant aux mesures des CMI des différents carbapénèmes, conduit par le Dr Suzanne Champion.

Les PCR ont été réalisées dans le laboratoire de microbiologie fondamentale et pathogénicité de l'Université de Bordeaux (UMR-CNRS 5234), sous la direction du Pr Véronique Dubois.

2.2 Origine des souches de *PA* :

Cette étude est une étude ancillaire du protocole hospitalier de recherche clinique (PHRC) Dynapyo, étude de cohorte prospective réalisée de Février à Octobre 2009 dans 10 services de réanimation de 8 hôpitaux français, ayant mis en évidence des facteurs de risque individuels et environnementaux d'acquisition de *PA* en réanimation, tels que la colonisation, la durée de ventilation mécanique, l'antibiothérapie préalable, la contamination des points d'eau, ou le nombre d'interventions infirmières (69).

La recherche systématique d'acquisition de *PA* a permis l'inclusion sur ces 8 centres de 1510 souches cliniques de *PA,* isolées par écouvillonnage nasal ou rectal, examen cytobactériologique des crachats, aspiration trachéale, écouvillonnage de cathéter ou hémoculture. 1201 étaient responsables d'une colonisation, et 309 d'infection patente.

Un antibiogramme était réalisé dans le laboratoire de bactériologie de la ville de prélèvement par la méthode des disques, et les souches catégorisées (sensibles « S », intermédiaires « I » ou résistantes « R ») selon les seuils critiques recommandés à l'époque de l'inclusion par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Toutes ces souches étaient génotypées par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), et toutes les souches étaient conservées à -80°C. Les souches étaient recueillies après accord des comités éthiques locaux, et conservées congelées à Bordeaux, centre coordonnateur du PHRC.

Les souches de 3 des 8 centres d'inclusion (Besançon, Bordeaux et Tourcoing) ont été utilisées après accord des responsables administratifs respectifs, soit un total de 326 souches.

2.3 Critères d'inclusion et d'exclusion :

Les souches de *PA* présentant une résistance à l'IMIPENEME ou au MEROPENEME selon les conclusions de l'antibiogramme (« I » ou « R ») étaient incluses.

Les souches redondantes étaient exclues. La redondance était définie comme la présence :

- Sur deux souches retrouvées chez le même patient, du même profil génotypique et phénotypique
- Sur deux souches retrouvées chez deux patients d'une même réanimation, du même génotype et du même antibiogramme, témoignant d'une très probable transmission croisée.

Dans ces situations, la souche considérée comme la plus pertinente cliniquement était sélectionnée.

Deux souches retrouvées chez le même patient, présentant le même génotype mais un phénotype différent, étaient considérées comme non redondantes et incluse toutes les deux, car posant deux problématiques différentes au clinicien.

Chaque souche incluse était soumise aux mêmes analyses :

- Lecture interprétative de l'antibiogramme par un microbiologiste clinicien
- Recherche des mécanismes de résistance par tests phénotypiques, simples et combinés
- Analyse génotypique (PCR), confirmée si besoin par technique d'hybridation (Southern Blot)

2.4 Tests diagnostiques phénotypiques :

2.4.1 Lecture interprétative de l'antibiogramme :

Les données de l'antibiogramme par la méthode des disques étaient analysées par 2 microbiologistes cliniciens. Un « profil » de résistance, pouvant contenir plusieurs

mécanismes différents, était inféré pour chaque souche, en fonction de l'analyse des différents diamètres mesurés pour chaque antibiotique. Les souches suspectes de carbapénémases étaient classées comme « suspectes ».

2.4.2 Tests phénotypiques simples :

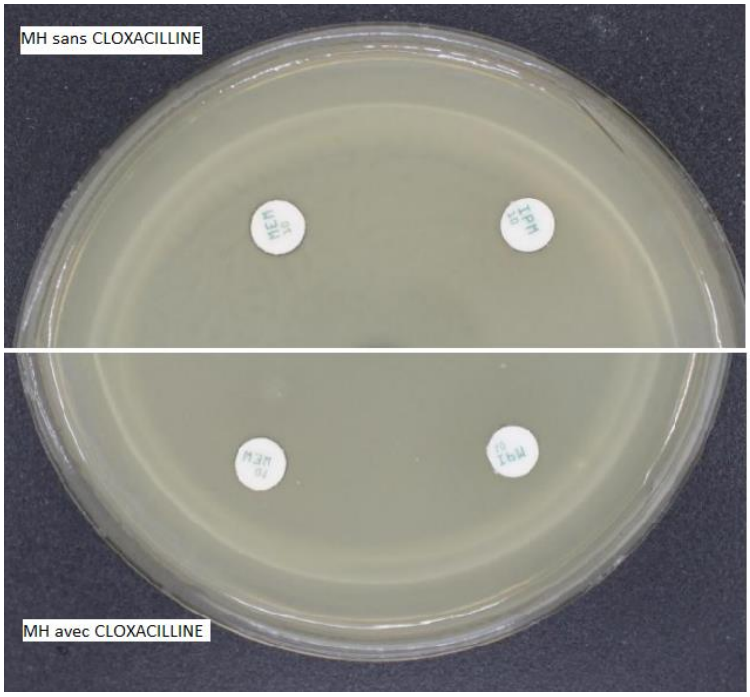
- Sensibilisation par la CLOXACILLINE :

Le rationnel de ce test réside dans le fait que seule *l'association* d'une *AmpC* hyperproduite et d'une perte de porine D2 peut rendre une souche de *PA* résistante aux carbapénèmes. La restauration de la sensibilité (augmentation du diamètre d'inhibition) via un inhibiteur de cette céphalosporinase chromosomique peut donc permettre de conclure sur le mécanisme.

Différentes modalités de sensibilisation par la CLOXACILLINE ont été décrites dans la littérature : Comparaison de diamètre avec disques pré-imprégnés (70), modification de la CMI ou du diamètre sur gélose de MH imprégnée de CLOXACILLINE (71,72)

Afin de dépister les souches productrices, le diamètre d'inhibition de l'IMIPENEME pour chaque souche a été comparé sur gélose de MH simple et sur gélose imprégnée de CLOXACILLINE à 400 µg/mL. Une augmentation de diamètre supérieure ou égale à 5 mm était considérée comme positive (72).

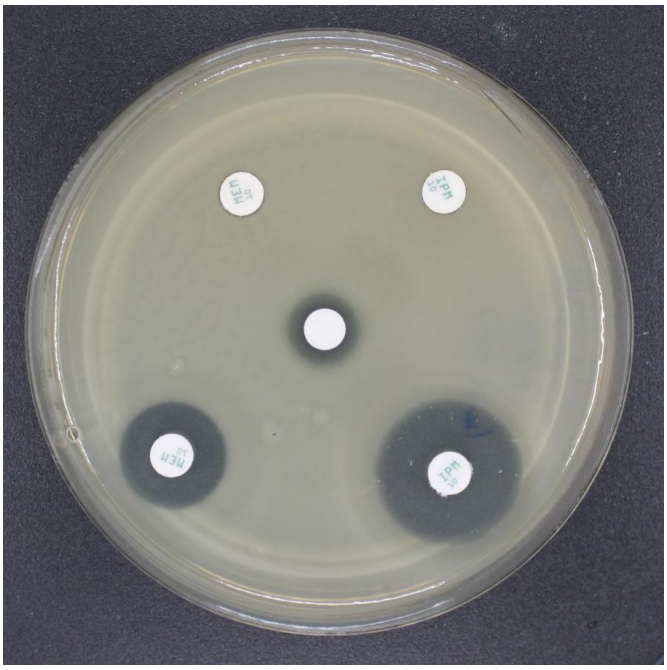
Figure 5 : Test à la CLOXACILLINE négatif : absence d'augmentation du diamètre sur gélose contenant de la CLOXACILLINE (souche porteuse d'une carbapénémase de classe B : VIM) :



- <u>Sensibilisation par l'EDTA :</u>

La sensibilisation par l'EDTA, évocatrice de la production par la souche d'une métallo-β-lactamase, était évaluée en comparant les diamètres d'inhibition de disques d'IMIPENEME et de MEROPENEME seuls, aux diamètres mesurés pour des disques d'IMIPENEME et de MEROPENEME implémentés d'EDTA (10 µL de solution d'EDTA à 200 millimolaire), sur gélose MH. L'inhibition était considérée comme effective si constatée pour l'IMIPENEME et le MEROPENEME, avec une différence de diamètre supérieure ou égale à 7 mm.

Figure 6 : test de sensibilisation à l'EDTA : Augmentation de diamètre pour l'IMIPENEME et le MEROPENEME sur disques imprégnés (en bas) (souche porteuse d'une carbapénémase de classe B : VIM) :



- Recherche de BLSE :

La recherche de synergie entre un disque de CEFTAZIDIME et un inhibiteur de β-lactamase, l'acide clavulanique (aspect en « bouchon de champagne ») était effectuée pour chaque souche, sur gélose MH imprégnée de CLOXACILLINE.

En effet, l'acide clavulanique étant un inducteur de céphalosporinase, la synergie peut être difficile à visualiser si la souche est hyperproductrice d'*AmpC*.

En cas de doute sur la présence ou pas d'une synergie, le test était répété jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

- Test d'augmentation de la CMI par PAβN :

Les CMI en milieu solide étaient déterminées pour chaque souche sur gélose de MH sans et avec PAβN à la concentration de 32 mg/L.

2.4.3 Tests phénotypiques combinés :

- ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit (Liofilchem® srl, Italie):

Ce combo-test utilise la méthode des disques, en combinant les inhibiteurs pour plus de sensibilité. Les diamètres de disques de MEROPENEME seul ou implémenté : d'acide dipicolinique (inhibiteur des carbapénémases de classe B, métallo- β-lactamases), d'acide boronique (inhibiteur des carbapénémases de classe A), de CLOXACILLINE (inhibiteur d'*AmpC*), sont comparés, et le diamètre d'inhibition de la TEMOCILLINE utilisé en cas de suspicion de carbapénémase de classe D (oxacillinase). Un algorithme décisionnel permet d'évoquer 4 types de mécanisme de résistance : carbapénémase de type KPC (classe A), métallo-carbapénémase, mécanisme autre (AmpC hyperproduite + perte de porine ou efflux actif), et enfin carbapénémase de classe D (OXA-48 like), en cas de résistance à la TEMOCILLINE.

Figure 7 : Algorithme d'interprétation du test ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit (données fournisseur) :

Interpretative Table. Synergy of meropenem with carbapenem inhibitors for confirmation of CRE.

Increase in inhibition zone of meropenem with the following inhibitor			Temocillin (TMO)*	β-lactamases
Phenylboronic acid (MR+BO)	Dipicolinic acid (MR+DP)	Cloxacillin (MR+CL)		
≥ **4 mm**	< 5 mm	< 5 mm	---	KPC
< 4 mm	≥ **5 mm**	< 5 mm	---	MBL
≥ **4 mm AND**	< 5 mm	≥ **5 mm**	---	AmpC + porin loss or efflux
< 4 mm	< 5 mm	< 5 mm	**< 11 mm**	OXA-48-like

*Temocillin susceptibility test is recommended only in cases where no synergy is detected.

- Mastdiscs ™ Carbapenemase Detection Set® (D70C) (MAST diagnostics, Grande Bretagne) :

Ce test utilise le même principe que le test précédent, avec comparaison des diamètres d'inhibition de disques contenant 10 µg de carbapénème seul (disque A) à des disques contenant le même dosage, auxquels sont adjoint respectivement un inhibiteur de métallo-carbapénémase (disque B), un inhibiteur de KPC (disque C), un inhibiteur d'*AmpC* (disque D).

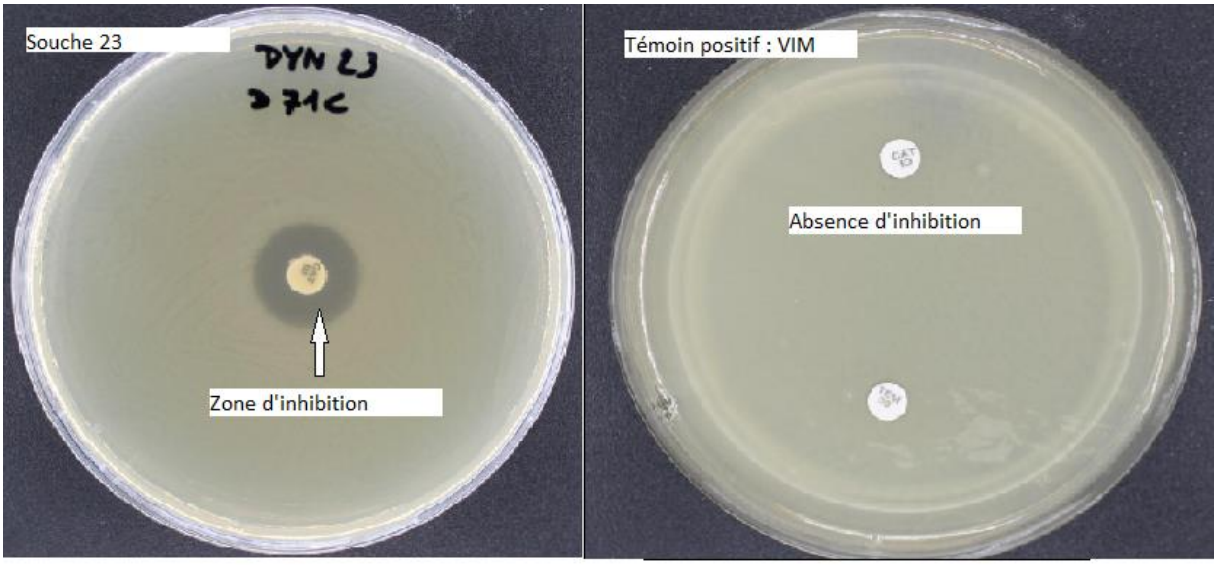
La souche est ainsi classifiée :

- MBL-positive si le disque B est supérieur ou égal de 5 mm par rapport au disque A, et que les diamètres des disques C et D ne sont pas supérieurs de plus de 3 mm au disque A.
- KPC-positive si le disque C est supérieur ou égal de 4 mm par rapport au disque A, et que les diamètres des disques B et D ne sont pas supérieurs de plus de 2 mm au disque A.
- *AmpC*-positive avec perte de porine si les disques C et D sont supérieur ou égal respectivement de 4 mm et 5 mm par rapport au disque A, et que le diamètre du disque B n'est pas supérieur de plus de 2 mm au disque A.

- Mastdiscs ™ CAT-ID™ - Carbapenemase Screening Disc (MAST diagnostics, Grande Bretagne) :

Ce test utilise les propriétés phénotypiques du FAROPENEME, carbapénème non commercialisée en France. L'interprétation, visuelle, s'intéresse au diamètre d'inhibition mesuré autour d'un disque imprégné de FAROPENEME : L'absence de zone d'inhibition est indicatrice de l'activité carbapénémase de type A ou B (KPC ou MBL par exemple), la présence d'une zone d'inhibition claire est indicatrice de l'absence d'activité carbapénémase, la présence d'un « double halo » (présence de colonies dans la zone d'inhibition est indicatrice de la présence d'OXA-48 (oxacillinase).

Figure 8 : Test Mastdiscs ™ CAT-ID™ : Absence de carbapénémase à gauche (souche 23), présence de métallo-carbapénémase (VIM) à droite (témoin positif) :

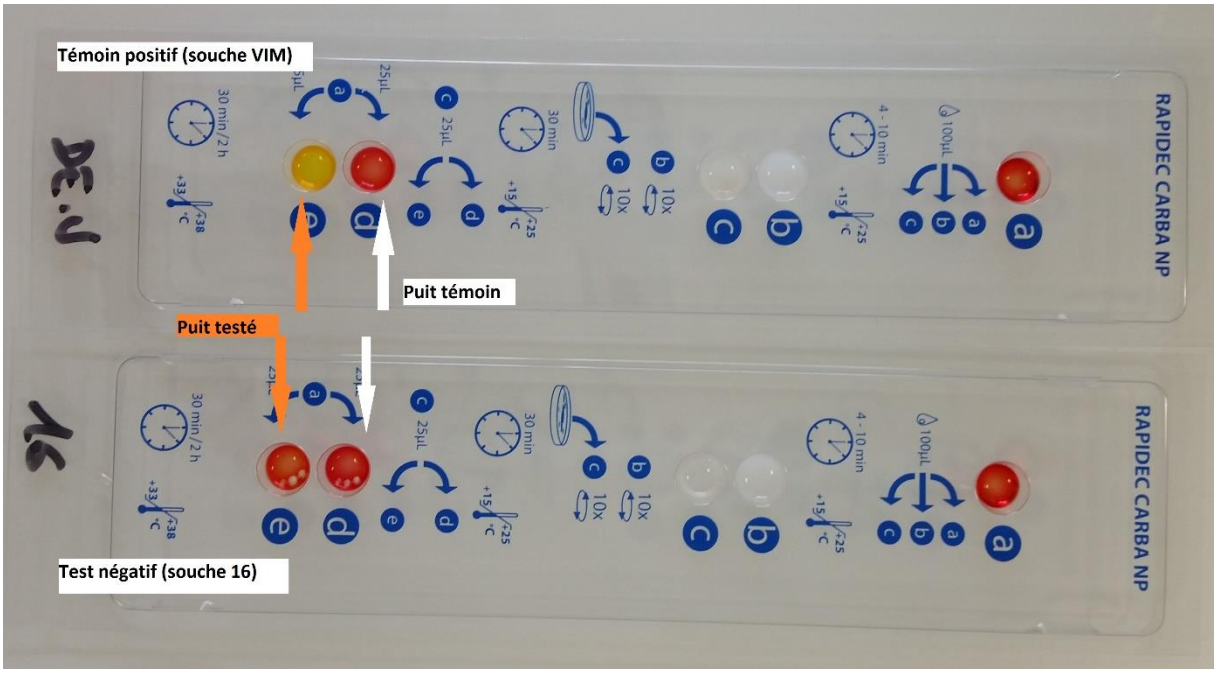


2.4.4 Tests phénotypiques enzymatiques

- Rapidec® Carba NP-test (bioMérieux SA, France) :

Ce test est basé sur la mise en évidence de l'hydrolyse d'un carbapénème par les bactéries productrices de carbapénémase. Cette hydrolyse se traduit par l'acidification du milieu, entraînant le virage d'un indicateur pH. Après une phase de lyse des bactéries permettant l'extraction de l'enzyme, le lysat est ajouté à une solution de révélation contenant de l'IMIPENEME (substrat de la carbapénémase), du rouge de phénol (indicateur pH), du zinc (nécessaire à l'activité des métallo-carbapénémases). Après un maximum de 2 heures d'incubation, la lecture est effectuée visuellement, par comparaison des couleurs du puit témoin et de celui contenant le mélange, le virage s'opérant du rouge ou rouge-orangé (puit témoin), vers l'orange ou le jaune, en cas de positivité.

Figure 9 : Rapidec® Carba NP-test : Témoin positif en haut (virage du puits test au jaune-orangé), test négatif en bas (souche 16)



2.5 Analyse génotypique de confirmation :

2.5.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) :

Les gènes des principales carbapénémases décrites chez PA (VIM, IMP, NDM-1, KPC, OXA-48, GES) étaient recherchés pour chaque souche par PCR Multiplex, de même que les gènes de BLSE les plus fréquents (TEM SHV, OXA, CTX1, CTX2, CTX9, PER, VEB, GES).

Les ADN de chaque souche étaient extraits et vérifiés, les ARN étaient testés, et chaque gène était testé en présence d'un témoin positif et d'un témoin négatif.

En cas de doute sur un des gels, ou de non-migration du témoin positif, la PCR était répétée, jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

2.5.2 Tests d'hybridation (Southern Blot) :

L'absence de gène de carbapénémase était confirmée par tests d'hybridation, sur sonde marquée à la DIGOXIGENINE (Roche Diagnostics, Allemagne). Les gènes des carbapénémases VIM et IMP étaient ainsi recherchés par cette méthode.

2.6 Analyse de concordance des résultats

Les résultats des différents tests étaient comparés à l'analyse génotypique. La sensibilité et la spécificité étaient évaluées pour ces tests.

Afin de faciliter l'analyse statistique, et devant la faible prévalence attendue de carbapénémases, 2 souches contrôles de *PA* étaient incluses dans l'analyse, servant de témoin positif. Ces souches cliniques, issues du CHU de Bordeaux, étaient porteuses d'une métallo-carbapénémase de type VIM, prouvée à la PCR. Elles étaient soumises aux mêmes tests phénotypiques de dépistage de carbapénémase que les autres souches incluses, afin de pouvoir déterminer des valeurs prédictives positives et négatives.

3. Résultats

3.1 Description des souches incluses :

Au total, 326 souches de *PA* avaient été recueillies et étudiées sur les 3 centres. Après décongélation, seules 272 ont pu être réensemencées.

Parmi celles-ci, 47 souches issues de 31 patients répondaient aux critères d'inclusion et d'exclusion : 11 souches provenant de Bordeaux, 17 de Tourcoing, et 19 de Besançon.

Parmi les 47 souches étaient retrouvés 24 génotypes différents : 12 génotypes étaient retrouvés chez une seule souche chacun, 6 génotypes présentaient 2 phénotypes différents,

2 génotypes présentaient 3 phénotypes différents, 3 génotypes présentaient 4 phénotypes différents, et 1 génotype présentait 5 phénotypes différents.

Ces souches étaient pour la plupart (42, soit 89,4%) à l'origine de colonisation (écouvillonnage rectal : 18 (38,3%), pharyngé : 7 (14,9%), sécrétions bronchiques : 17 (36%)). Seules 5 (10,6%) étaient responsables d'infections patentes : 2 (4,3%) d'infection pulmonaire, 2 (4,3%) d'infection liée à un cathéter, 1 (2,1%) de bactériémie.

Figure 10 : Diagramme de flux :

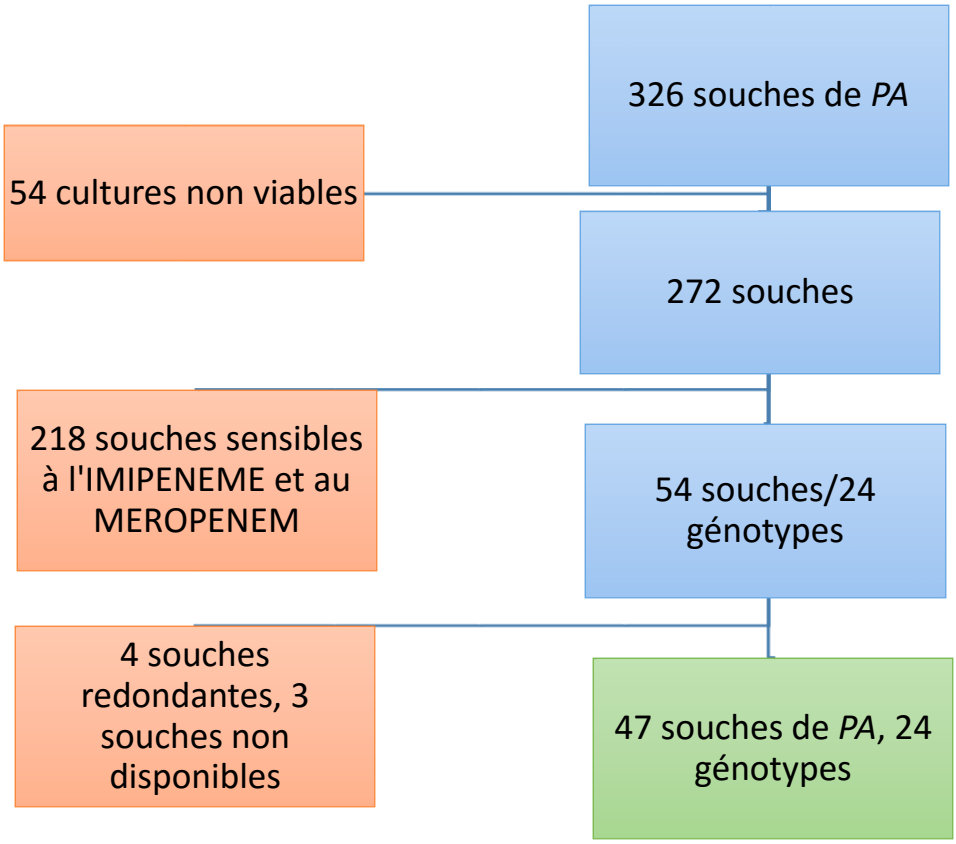
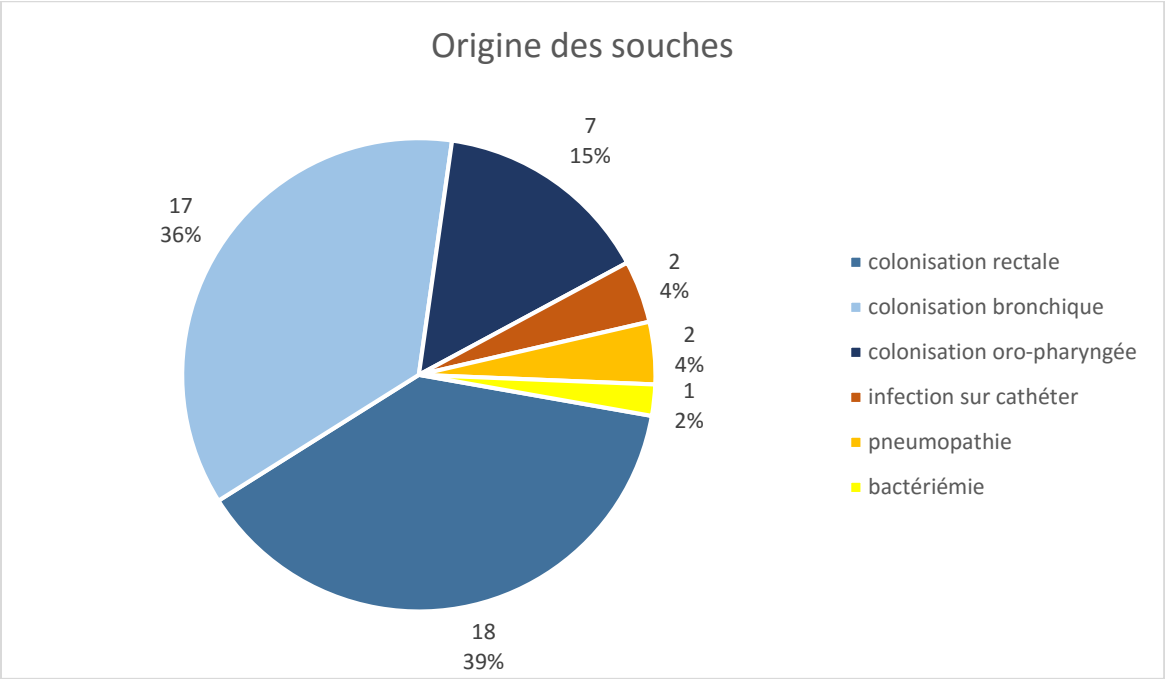


Figure 11 : Contexte clinique d'origine des souches incluses :



3.2 Résultats de la lecture interprétative de l'antibiogramme

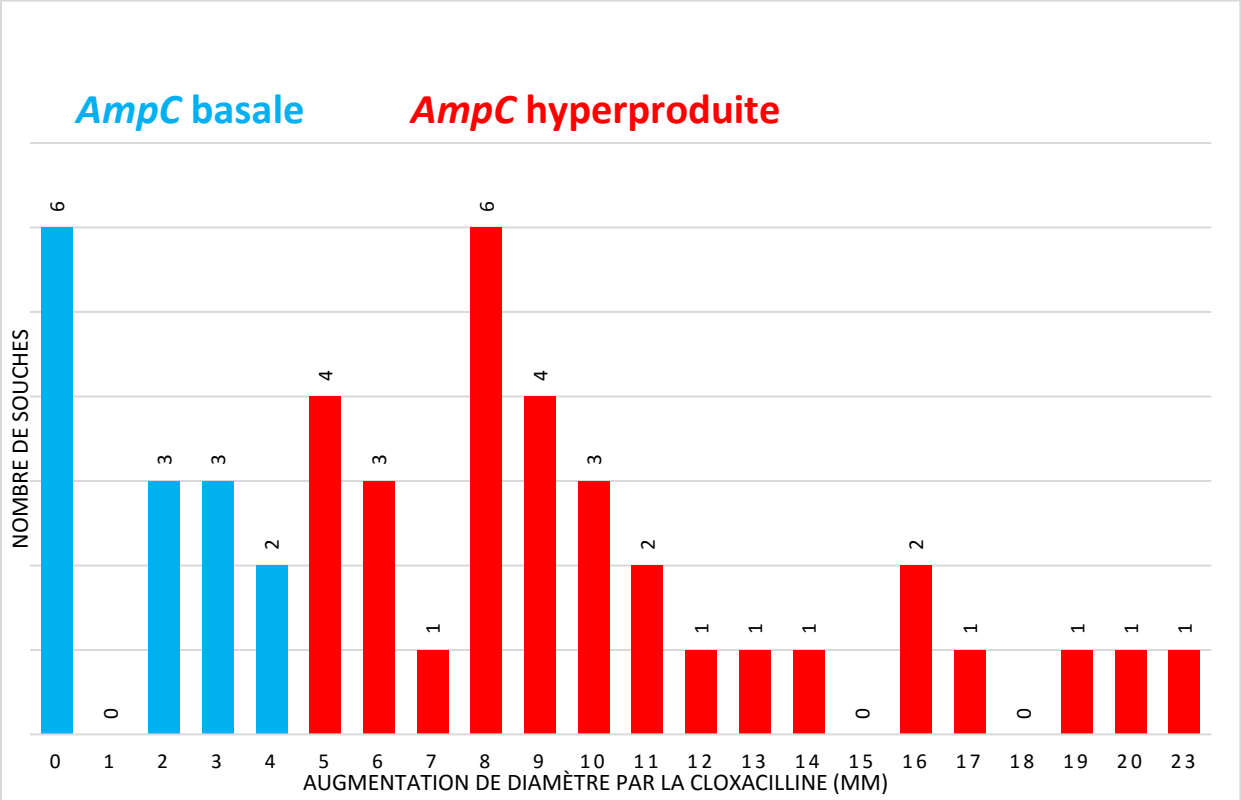
Sur les 47 souches, à la suite de la lecture des diamètres, 14 (29,8%) étaient considérées comme suspectes de carbapénémases, 32 (68,1%) étaient suspectes de perte de porine D2, 10 (21,3%) étaient suspectes d'*AmpC* hyperproduite, 10 (23,1%) étaient suspectes de mécanisme d'efflux, 6 (12,8%) étaient suspectes de pénicillinase.

3.3 Résultats des tests phénotypiques

- <u>Recherche de céphalosporinase déréprimée :</u>

Sur les 47 souches incluses, l'augmentation moyenne de diamètre par la CLOXACILLINE était de 7,67mm. En utilisant le seuil de 5 mm, le test d'inhibition par la CLOXACILLINE était positif pour 33 souches (70,2%), faisant suspecter la présence d'une *AmpC* hyperproduite sur ces souches.

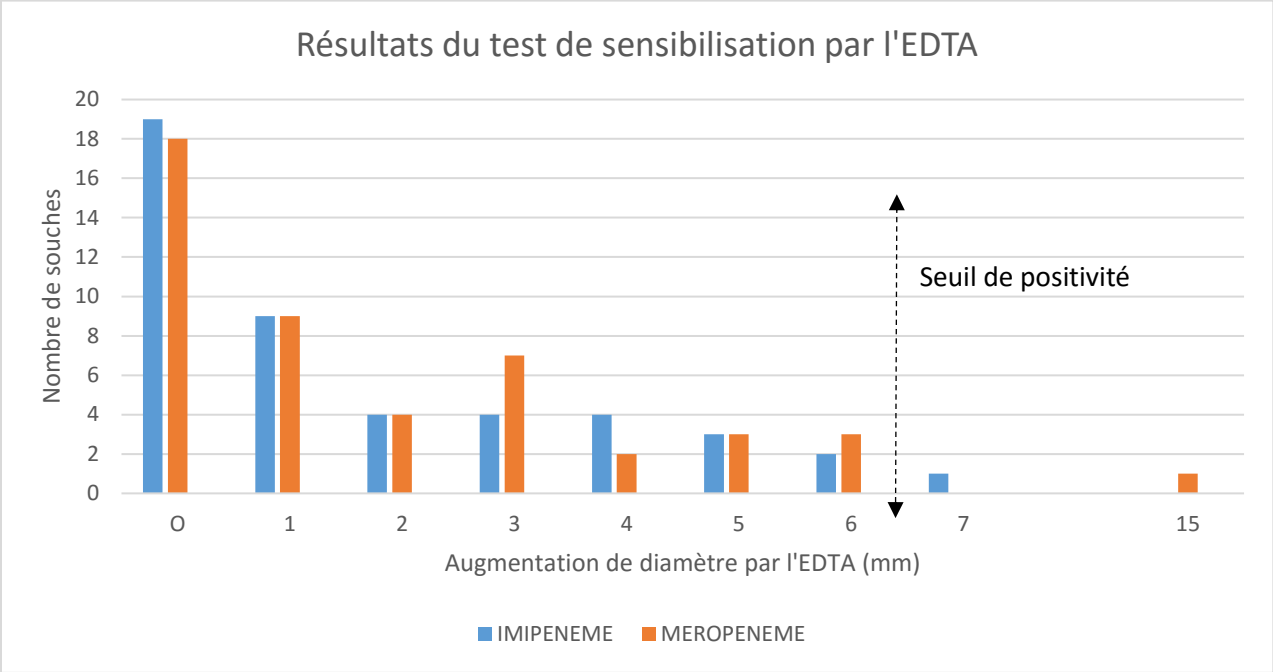
Figure 12 : Résultats de la recherche phénotypique de céphalosporinase hyperproduite : En rouge : *AmpC* déréprimée, en bleu : *AmpC* basale



- <u>Test à l'EDTA :</u>

L'augmentation moyenne du diamètre par l'EDTA était de 1,72 mm pour l'IMIPENEME, et de 2 mm pour le MEROPENEME. Une augmentation significative de diamètre par l'EDTA (supérieure ou égale à 7mm) n'était observée que pour 2 souches : Pour l'une (souche n°27) sur l'IMIPENEME, pour l'autre (souche n°50) sur le MEROPENEME.

Figure 13 : Résultats du test phénotypique de dépistage des métallo-carbapénémases par l'EDTA :



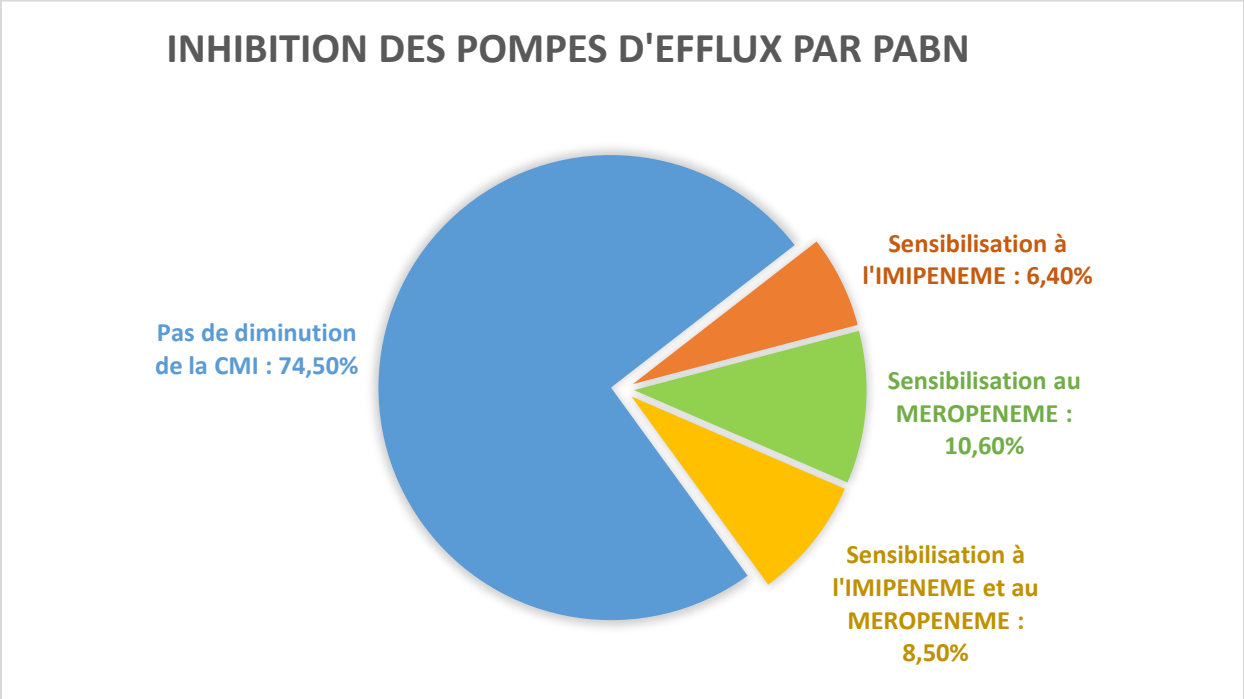
- Recherche de BLSE :

Une synergie a été observée pour 3 souches (6,4%). La présence de BLSE n'a été confirmée par l'analyse génotypique pour aucune de ces 3 souches.

- Test d'inhibition de l'efflux :

Une diminution de la CMI sur milieu imprégné de PAβN était observée sur un total de 12 souches (soit 25,5%) : sur 3 souches (6,4%) pour l'IMIPENEME, sur 5 souches (10,6%) pour le MEROPENEME, et sur 4 souches (8,5%) pour les deux molécules.

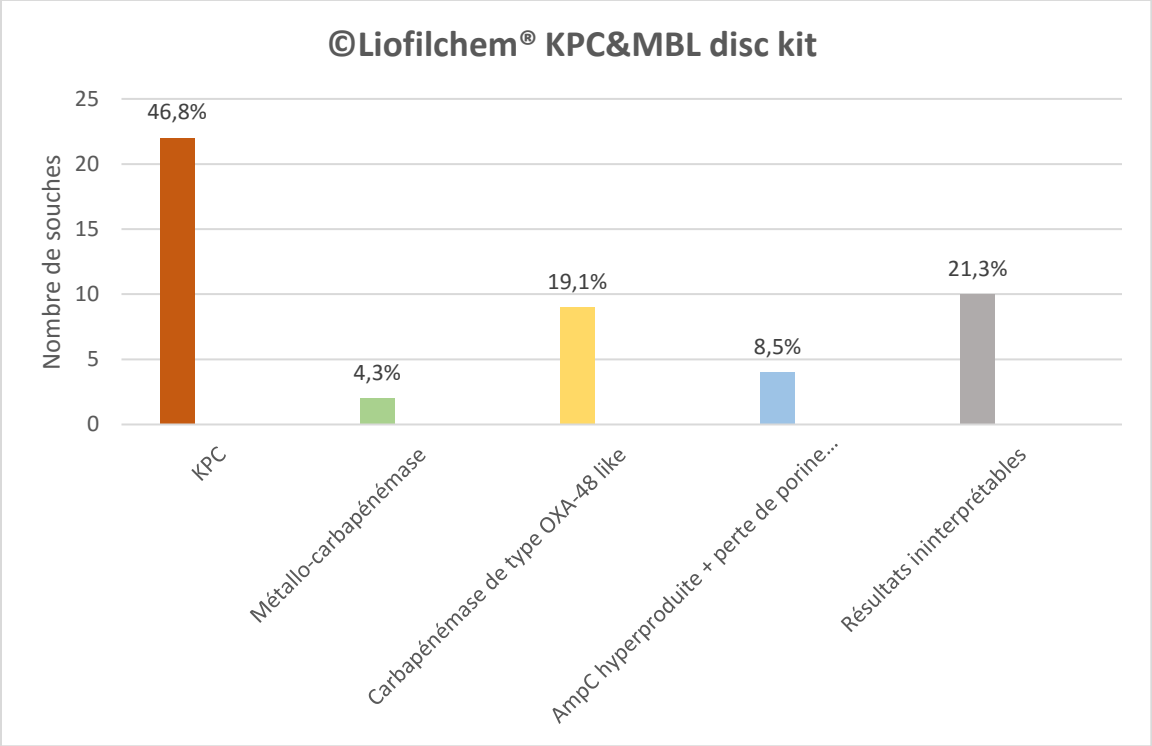
Figure 14 : Résultats de la recherche phénotypique d'efflux actif (test d'inhibition par PAβN) :



- Test ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit :

Concernant les tests combinés, les conclusions du test ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit ont été les suivantes : présence d'une carbapénémase de type KPC sur 22 souches (46,8%), présence d'une carbapénémase de type OXA-48-like pour 9 souches (19,1%), présence d'une association *AmpC* hyperproduite et d'un mécanisme non enzymatique pour 4 souches (8,5%), présence d'une métallo-carbapénémase pour 2 souches (4,3%), résultats ininterprétables selon l'algorithme décisionnel pour10 souches (21,3%).

Figure 15 : Résultats du test ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit sur les 47 souches :

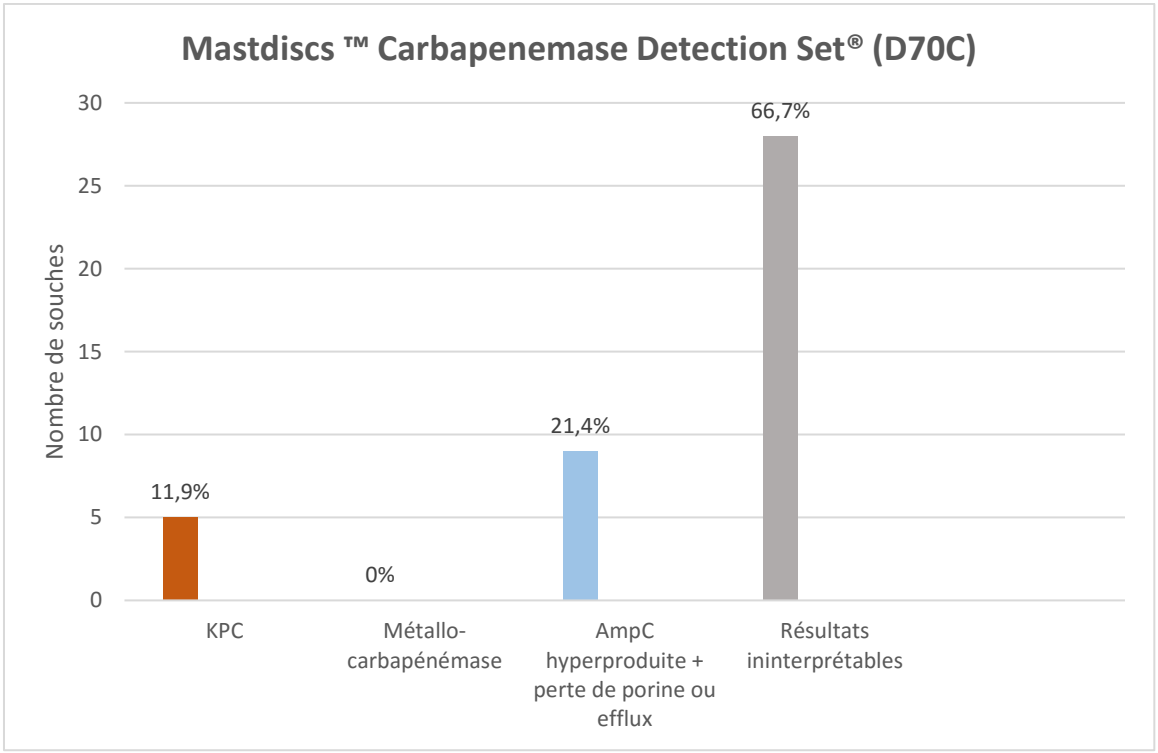


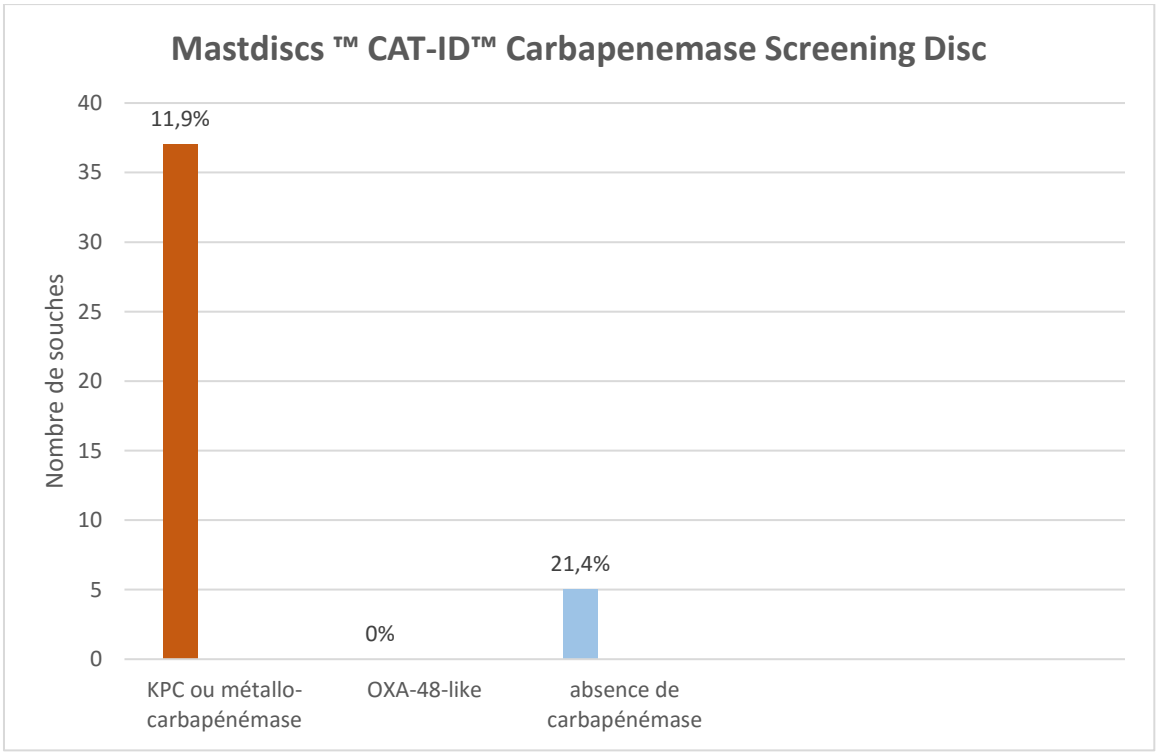
- <u>Tests Mast D70C et CAT-ID™:</u>

Les tests Mastdiscs ™ D70C et Mastdiscs ™ CAT-ID™ Carbapenemase Screening Disc n'ont pu être effectués que sur 42 souches, 5 souches n'ayant pas pu être ré-ensemencées après décongélation. Aucune de ces 5 souches manquantes n'était positive pour une carbapénémase ou une BLSE à l'analyse génotypique. Les résultats ont été les suivants :

- Pour le test D70C : Présence d'une carbapénémase de type KPC sur 5 souches (11,9%), présence d'une *AmpC* hyperproduite et d'une perte de porine D2 sur 9 souches (21,4%), absence de souche porteuse de métallo-carbapénémase, résultats ininterprétables pour 28 souches (66,7%).
- Pour le test CAT-ID™ : Absence de zone d'inhibition pour 37 souches (88,1%), en faveur de la présence d'une carbapénémase de type KPC ou MBL, présence d'une zone d'inhibition nette pour 5 souches (11,9%)

Figure 16 : Résultats des tests Mast® :





- Rapidec® Carba NP-test :

Un virage colorimétrique, du rouge au rouge-orangé, interprété comme un résultat positif, a été observé pour 2 souches (Souches 30 et 39).

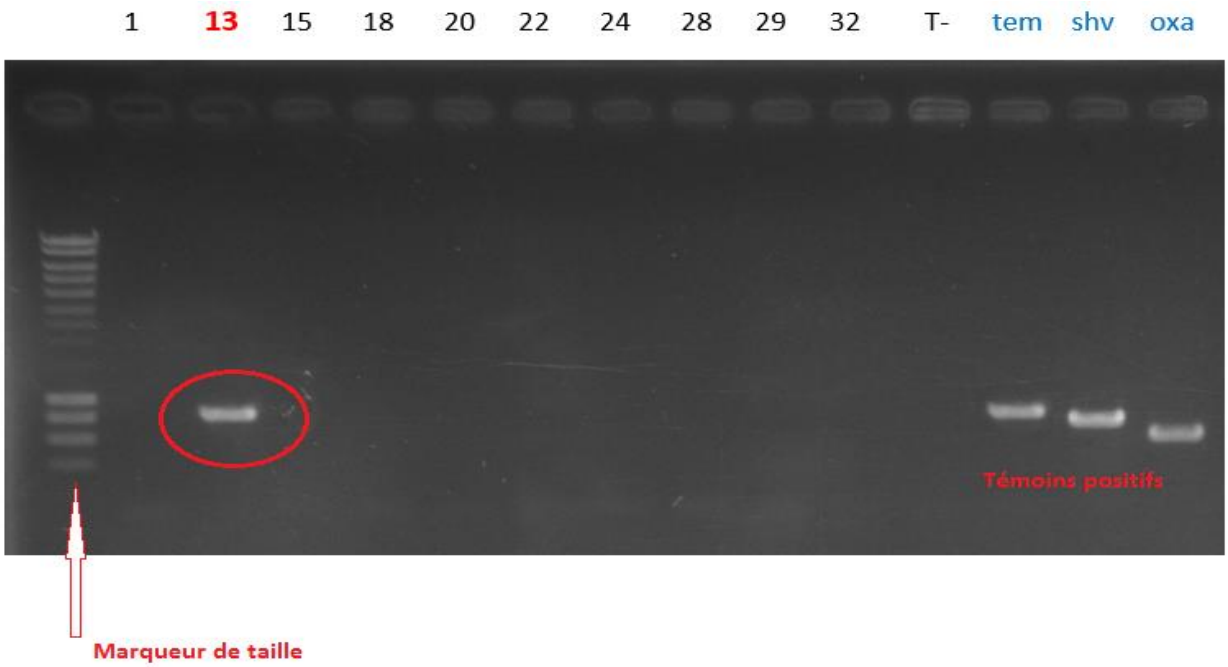
Par ailleurs, le test a été franchement positif (virage colorimétrique du rouge au jaune-orangé) pour les 2 souches témoins positifs.

3.4 Résultats de l'analyse génotypique

Concernant l'analyse génotypique, les résultats de la PCR multiplex n'ont mis en évidence aucune carbapénémase connue, 2 souches étaient porteuses de BLSE, l'une de type TEM (souche n°13), l'autre de type CTX-9 (souche n°23).

La recherche de carbapénémases de type VIM ou IMP par test d'hybridation était également négative, confirmant les données de la PCR.

Figure 17 : Gel PCR Multiplex pour les BLSE TEM, SHV, OXA (positivité de la souche 13 pour TEM) :



3.5 Concordance

L'analyse génotypique, considérée dans notre étude comme le *Gold Standard*, n'a pas mis en évidence de gène de carbapénémase parmi les souches incluses. Or, les tests phénotypiques combinés ont rendus des résultats positifs pour de nombreuses d'entre-elles, et sont donc marqués par des spécificités très faibles. Devant l'absence de souche productrice de carbapénémase, il n'a pas été possible d'estimer de valeur de sensibilité. De plus, pour chacun de ces tests, de nombreux résultats obtenus sont ininterprétables selon l'algorithme décisionnel proposé. En considérant ces résultats ininterprétables comme non en faveur de présence de carbapénémase, seules des spécificités (Sp) de ces tests pouvaient être estimées, comme suit :

- Test ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit : Sp = 29,8%
- Mastdiscs ™ Carbapenemase Detection Set® (D70C) : Sp = 88,1%
- Mastdiscs ™ CAT-ID™ - Carbapenemase Screening Disc : Sp = 11,9%
- Rapidec® Carba NP-test : Sp : 95,7%

L'inclusion de 2 souches-témoins positives porteuses de métallo-carbapénémase, soumises aux mêmes tests phénotypiques, permettait d'estimer des valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN), ainsi :

- les valeurs diagnostiques du test à l'EDTA, étaient :
    - En utilisant pour seuil de positivité une augmentation de diamètre supérieure ou égale à 7 mm pour l'IMIPENEME ou le MEROPENEME :

Sensibilité : 100%, spécificité : 95,7%, valeur prédictive positive : 50%, valeur prédictive négative : 100%

    - En utilisant pour seuil de positivité une augmentation de diamètre supérieure ou égale à 7 mm pour l'IMIPENEME *et* le MEROPENEME :

Sensibilité : 100%, spécificité : 100%, valeur prédictive positive : 100%, valeur prédictive négative : 100%

En effet, l'augmentation de diamètre sur disque implémenté d'EDTA était supérieure à 7 mm pour l'IMIPENEME et le MEROPENEME, pour ces 2 souches (respectivement de 11 et 11mm pour la première, et 16 et 10 mm pour la deuxième).

- Jugée en tant que test diagnostique et comparée à la PCR, la lecture interprétative de l'antibiogramme par les microbiologistes cliniciens à la recherche de carbapénémase obtenait les résultats suivants : Sensibilité : 100% (les 2 souches témoins positives ayant été considérées, en aveugle du résultat de la PCR, comme suspectes), spécificité 70,2% (14 faux positifs), valeur prédictive positive : 12,5%, valeur prédictive négative : 100%
- Pour le test ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit : Se : 100%, Sp : 29,8%, VPP : 5,7%, VPN : 100%, ce test ayant permis de dépister les 2 souches positives.
- Pour le test Mastdiscs ™ Carbapenemase Detection Set® (D70C) : Se : 0%, Sp : 88,1%, VPP : O%, VPN : 94,9%
- Pour le test Mastdiscs ™ CAT-ID™ : Se : 100%, Sp : 11,9%, VPP : 5,1%, VPN : 100%
- Pour le Rapidec® Carba NP-test : Se : 100%, Sp : 95,7%, VPP : 50%, VPN : 100%
- Concernant le test phénotypique de recherche de BLSE, ses performances statistiques étaient nulles (Se = 0%), car il n'a permis de détecter aucune des 2 souches productrices de BLSE.

Tableau 4 : Performances statistiques des tests évalués, en incluant 2 témoins positifs à l'analyse :

	Se	**Sp**	**VPP**	**VPN**
Lecture interprétative de l'antibiogramme	100%	70,2%	12,5%	100%
Test à l'EDTA	100%	100%	100%	100%
Test de recherche de BLSE	0%	93,3%		
©Liofilchem® KPC&MBL disc kit	100%	29,8%	5,7%	100%
Mastdiscs ™ Carbapenemase Detection Set® (D70C)	0%	88,1%	0%	94,9%
Mastdiscs ™ CAT-ID™ - Carbapenemase Screening Disc	100%	11,9%	5,1%	100%
Rapidec® Carba NP-test	100%	95,7%	50%	100%

4. Discussion

Les mécanismes prédominants de résistance aux carbapénèmes identifiés dans notre population de *PA* sont principalement chromosomiques, avec notamment 70,2% de céphalosporinases hyperproduites, 25,5% d'efflux actifs. Concernant les mécanismes transmissibles, il n'a pas été mis en évidence de carbapénémase sur les 47 souches incluses dans notre étude, et seulement 4,3% (2 souches) de BLSE.

Les tests phénotypiques combinés de dépistage des carbapénémases disponibles sur le marché ont montré de très médiocres performances statistiques dans notre population, à l'opposé, la lecture interprétative de l'antibiogramme et le test simple à l'EDTA semblent efficaces et spécifiques pour détecter les souches productrices de métallo-carbapénémases.

La très faible prévalence des carbapénémases par rapport aux autres mécanismes de résistance chez *PA*, a déjà été décrite dans la littérature. Samuelsen *et al.* (73), dans une étude multicentrique norvégienne de 2007 similaire à la nôtre, a montré, sur un échantillon de 60 souches cliniques de *PA* résistantes à l'IMIPENEME et/ou au MEROPENEME, une prévalence de 3% de carbapénémases.

Castanheira *et al*. (47) rapportaient en 2014 une proportion plus importante de carbapénémases dans les souches résistantes aux carbapénèmes, dans une étude internationale focalisée sur une zone d'endémie (pourtour méditerranéen), avec une prévalence de 20% de métallo-carbapénémases, néanmoins, ce mode de résistance restait moins répandu que la perte de porine (94,9%), que la céphalosporinase hyperproduite (44,4%), et au même niveau que les mécanismes d'efflux (20,1%). Par ailleurs, sur les 72 souches françaises de cette étude, une seule était porteuse de carbapénémase.

A l'échelle française :

- L'étude multicentrique de Cavallo *et al.* réalisée en 2004 (45), n'a mis en évidence, parmi les 76 souches à sensibilité diminuée à l'IMIPENEME, que 2 souches productrices de carbapénémase de type VIM-2.
- Hocquet *et al*., dans une étude multicentrique ayant regroupé sur 85 hôpitaux français en 2007, 140 souches de PA résistantes à la CEFTAZIDIME, a retrouvé 2,9% de métallo-carbapénémase, et, de façon originale, 3,6% d'oxacillinases à spectre étendu (74).
- Plus récemment, en 2010, Fournier *et al.*, dans une étude multicentrique (75) incluant, sur 26 services de réanimation français, 109 souches résistantes à l'IMIPENEME (CMI>4 mg/L), ont retrouvé 6,4% de métallo-carbapénémases, 86,2% de pertes de porines, et 11,9% d'efflux actifs.

En Espagne, une étude multicentrique ayant inclus de 2008 à 2009, sur 16 hôpitaux, 175 souches de *PA* de sensibilité diminuée aux carbapénèmes, a retrouvé une prévalence de métallo-carbapénémases de 6,9%. L'étude des autres mécanismes, effectuée sur 60 souches non productrices, avait rapporté 99% de pertes de porines, 80% d'efflux hyperexprimés, 50% d'*AmpC* déréprimée (76).

La faible prévalence de résistance plasmidique (BLSE ou carbapénémase) retrouvée dans notre étude est donc cohérente avec l'épidémiologie française et des zones non endémiques.

A l'inverse, et pour exemple de l'épidémiologie retrouvée en contexte épidémique, Azim *et al.* montrent, en étudiant la colonisation à l'admission d'un service de réanimation indien en 2009, un taux de métallo-carbapénémases de 57% chez les patients colonisés à *PA* (77).

Hors période épidémique et zone d'endémie, c'est dans la sous-population des souches multirésistantes que sont sur-représentés les mécanismes enzymatiques transmissibles (carbapénémase et BLSE), comme le montrent Li *et al.* dans une étude multicentrique ayant retrouvé en 2016, sur 37 souches chinoises de *PA* multi ou toto-résistantes, une prévalence de BLSE de 100%, de 35,1% de métallo-carbapénémases (avec coexistence sur une même souche de 2 métallo-carbapénémases différentes) (78).

Concernant la prévalence des BLSE, elle est de 4,3% dans notre population (2 de classe A : une de type CTX-9, une de type TEM). Cette faible prévalence a été retrouvée dans des études similaires : Dans l'étude précédemment citée de Hocquet *et al.* (74) par exemple, la prévalence des BLSE était identique (4,3%).

Ces différentes études montrent la variabilité importante des parts respectives des différents mécanismes de résistance entre pays, même proches. Cette variabilité est le reflet du lien étroit existant entre habitudes de stratégies antibiotiques et épidémiologie de la résistance, chez *PA* notamment.

Les carbapénémases sont le plus souvent responsables de pics épidémiques, et ne subsistent probablement que faiblement de façon prolongée chez *PA*. Ce germe, par sa rusticité et son réservoir propre, peut donc être davantage considéré comme une forme de « mémoire épidémiologique » d'un service, voire d'un hôpital, plus que d'un individu.

La connaissance de l'épidémiologie d'un service revêt donc toute son importance dans la manière d'aborder la résistance aux antibiotiques, qu'il s'agisse de *PA* ou d'autres espèces bactériennes.

La part relative des autres mécanismes de résistance (*AmpC* ou mécanismes non enzymatiques) est très variable selon les études. Il n'a pas été possible dans notre étude de quantifier la proportion de pertes de porines, faute de test phénotypique fiable disponible pour les mettre en évidence. D'autre part, et contrairement aux travaux précédemment cités, nous n'avons pas recherché par PCR les gènes codant pour ces mécanismes, et la part relative de chacun reste donc dans cette étude du domaine de l'estimation, avec des outils phénotypiques dont la fiabilité est décrite dans la littérature. Mais, plus que l'importance relative de l'un par rapport à l'autre, l'élément notable reste leur association fréquente. Seule cette association de mécanismes peut en effet occasionner une résistance significative aux carbapénèmes. *In fine*, cette question peut être vue comme secondaire, la seule réponse cruciale pour le clinicien étant de distinguer résistance transmissible (BLSE ou carbapénémase) et résistance chromosomique. Une originalité de ce travail aura donc été de s'attacher à rechercher BLSE et carbapénémases dans une même population, la barrière génétique entre les deux étant mince.

Peu d'études disponibles dans la littérature se sont intéressées spécifiquement à la description épidémiologique des mécanismes de résistance de *PA* aux carbapénèmes en réanimation. A l'exception de l'étude de Fournier précédemment citée (75), les quelques travaux similaires disponibles dans la littérature sont monocentriques (79), ou de très faible effectif (80). Or, la sensibilité de *PA* aux antibiotiques, notamment aux carbapénèmes, est plus faible en réanimation. Le lien entre cette diminution de sensibilité et la prescription importante de carbapénèmes et d'autres β-lactamines en réanimation est bien documenté (48–51). Le praticien de réanimation est donc plus souvent confronté à la problématique d'une souche de *PA* résistante aux carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours. Afin de guider la conduite à tenir, et d'inférer un mécanisme de résistance, la connaissance de l'épidémiologie locale est donc de première importance. Dans ce domaine, notre étude montre que les premiers mécanismes à suspecter sont donc chromosomiques.

Au vu des résultats des études citées précédemment, et des rapports de l'ONERBA, la France apparaît comme un pays à faible prévalence de carbapénémases. Cette relative absence de pics épidémiques ne doit pas faire minimiser la problématique générée par l'émergence de ces enzymes dans d'autres régions du globe, et la menace potentielle qu'elle représente pour

l'écologie de nos services. Elle souligne, d'une part l'importance de l'arsenal intrinsèque de *PA* pour s'adapter aux antibiotiques, et, d'autre part, doit encourager les mesures d'épargne des carbapénèmes, qui ont pu contribuer à cet effet protecteur (81).

Concernant l'étude de corrélation des tests phénotypiques, les performances statistiques mesurées pour les tests phénotypiques combinés de dépistage des carbapénémases, ont été très médiocres.

Ces tests, développés et validés chez les entérobactéries (82–84), montrent des résultats bien plus mitigés chez *PA* (85,86), avec des sensibilités et des spécificités variables selon les seuils choisis.

Ainsi, en 2014, Peter *et al*. obtenaient, sur 133 souches cliniques de PA résistantes au MEROPENEME, les performances respectives pour les tests Mastdiscs ™ Carbapenemase Detection Set® (D70C) et KPC+MBL-confirm ID kit® (Rosco Diagnostica, Denmark) (test concurrent du test ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit, utilisant les mêmes inhibiteurs) : sensibilité 28,8% et 31,1%, spécificité 79,6% et 69,3%.

A notre connaissance, aucune étude publiée dans la littérature n'avait évalué chez *PA* les tests ©Liofilchem® KPC&MBL disc kit et Mastdiscs ™ CAT-ID™ - Carbapenemase Screening Disc. Les performances de ces 2 tests sont médiocres, dans une population à très faible prévalence de carbapénémase.

Les très mauvais résultats enregistrés par le test Mastdiscs ™ CAT-ID™ peuvent s'expliquer par le fait que ce test utilise comme marqueur la sensibilité au FAROPENEME, carbapénème non commercialisée en France, peu active contre *PA* (87).

La prévalence des carbapénémases dans notre population implémentée de 2 témoins positifs restait néanmoins très faible, et a probablement impacté les performances diagnostiques de ceux-ci, qui ne représentent qu'un résultat secondaire de notre étude.

L'équipement enzymatique basal de *PA*, et donc son comportement *in vitro* sont différents de ceux des entérobactéries, et l'extrapolabilité sur *PA* de tests développés sur ces mêmes entérobactéries doit être prudente. Aucun des tests phénotypiques de dépistage de carbapénémase commercialisé n'a été initialement développé pour *PA*. Cela peut s'expliquer par l'importance relative beaucoup plus importante de la problématique des carbapénémases chez les entérobactéries que chez *PA*.

A l'opposé, le test à l'EDTA semble montrer de bonnes performances diagnostiques dans la détection des métallo-carbapénémases dans notre population. Ces résultats concordent avec ceux de Samuelsen *et al.* précédemment cités (73), qui retrouvaient, dans une population de *PA* ayant une prévalence similaire de métallo-carbapénémases que la nôtre (2/60), une sensibilité de 100% et une spécificité de 91%.

Ce test, peu coûteux et de réalisation simple, permet donc de dépister avec efficacité et spécificité les souches de *PA* productrices de métallo-carbapénémases. Il a donc sa place en pratique clinique courante, en cas de doute sur le mécanisme de résistance d'une souche de sensibilité diminuée aux carbapénèmes. 2 limites de ce test sont néanmoins à souligner : Le délai supplémentaire d'environ 24 heures à l'obtention d'une réponse, et le fait que ce test ne permette de dépister que les carbapénémases de classe B (métallo-carbapénémases), qui restent néanmoins majoritaires chez *PA*.

Concernant les performances du Rapidec® Carba NP-test, le plus récent, et qui fonctionne sur un principe différent de celui des autres tests phénotypiques, elles sont marquées par une très bonne sensibilité, mais une spécificité sub-optimale. Une des raisons pouvant expliquer la présence de faux-positifs concernant ce test est la définition floue du seuil de positivité. En effet, selon les recommandations du fabriquant, et en accord avec les études princeps ayant validé ce test chez les entérobactéries (88) et chez *PA* (63), un virage de couleur, même modéré (du rouge au rouge-orangé) est à considérer comme positif. Or la visualisation de ce changement minime de couleur peut être difficile, et son appréciation est opérateur-dépendante.

A ces performances diagnostiques s'ajoute le caractère rapide de l'obtention du résultat (quelques minutes), et sa capacité à dépister tous les types de carbapénémases. Cependant, son coût (15,4€ par kit en France au 20/09/2016), les conditions de conservation strictes (85),

laissent penser que son utilisation chez *PA* en routine ne doit pas être systématique en situation de faible prévalence. En effet, le recours systématique à l'analyse génotypique (Gold Standard) pour les souches, peu nombreuses, suspectes au vu des tests phénotypiques «simples» et de la lecture interprétative de l'antibiogramme peut se justifier, de même que l'envoi pour analyse à un centre expert.

Par ailleurs, l'amélioration des techniques génotypiques et non-génotypiques, comme la spectrométrie de masse (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation time-of-flight : MALDI-TOF), dans la rapidité et la fiabilité du diagnostic de carbapénémases (89,90), constituent des perspectives intéressantes pour un dépistage rapide.

Les mauvaises performances du test phénotypique de dépistage des BLSE observées dans notre étude ont déjà été rapportées dans la littérature (91), mais principalement concernant les BLSE de classe D (oxacillinases), spontanément moins inhibées par l'acide clavulanique. La présence d'une *AmpC* déréprimée, fortement présente sur notre population, a souvent été décrite comme facteur confondant pouvant compromettre la sensibilité de ce test. Nous avions donc pris soins d'implémenter la gélose de CLOXACILLINE, afin de s'affranchir de son action. Cela ne nous a pas permis de mettre en évidence les BLSE de classe A présentes sur 2 de nos souches.

Cette étude présentait des limites supplémentaires : Structurellement, la prévalence des carbapénémases dans notre population implémentée de 2 témoins positifs restait très faible, ce qui impacte les résultats des valeurs prédictives positives et négatives retrouvées.

D'autre part, 54 (16%) des 326 souches des 3 centres n'étaient pas viables, ce qui ampute la sélection d'un certain nombre de souches potentiellement incluables, et impacte donc également la représentativité de nos résultats

Par ailleurs, la période d'inclusion des souches remonte à 2009. Or l'épidémiologie des services de réanimation a possiblement évolué depuis, bien que des études similaires plus récentes retrouvent des résultats semblables (75), et que, comme vu précédemment, la prévalence de la résistance aux carbapénèmes est restée assez stable depuis.

L'absence de sérotypage des souches dans cette étude ne nous a pas permis de décrire les tendances selon les sérotypes.

Enfin, une des limites de la PCR, notre *Gold Standard*, réside principalement dans le fait qu'elle ne permet de mettre en évidence que des séquences géniques déjà connues, or de nouvelles carbapénémases sont régulièrement découvertes, et de multiples variations alléliques sont décrites pour chacune. En cas de doute persistant, le recours à l'hybridation, voire au séquençage du génome de la souche doit être discuté.

Dans cette optique, 2 de nos souches (souches 30 et 39) ont été envoyées pour séquençage au Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, coordonné par le Laboratoire de Bactériologie du Pr Pléziat (CHRU de Besançon).

5. Conclusion

Sur cette population de souches de réanimation françaises de *PA*, la résistance aux carbapénèmes était due en grande majorité à des mécanismes non-enzymatiques et chromosomiques, donc non justiciables de mesures d'isolement particulières. Cette faible prévalence de carbapénémases chez *PA* est possiblement le témoin de l'efficacité de la politique d'épargne des carbapénèmes en France.

Dans cette étude, l'apport diagnostique des tests phénotypiques de dépistage des carbapénémases, à l'exception du test simple à l'EDTA, a été faible, et dans ce contexte de faible prévalence de carbapénémases chez *PA*, ne nous semble pas justifier leur utilisation en routine.

Cette étude souligne l'importance de la connaissance de l'écologie locale, la valeur de la lecture interprétative bien conduite de l'antibiogramme dans la compréhension des mécanismes de résistance de *PA* aux antibiotiques.

Références :

1. Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of Pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns J Int Soc Burn Inj. juin 2002;28(4):340-8.

2. Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 sept 2005;41(6):848-54.

3. Vincent J, Rello J, Marshall J, et al. INternational study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA. 2 déc 2009;302(21):2323-9.

4. Rapport_REA2014.pdf [Internet]. [cité 15 mai 2016]. Disponible sur: http://www.cclinparisnord.org/REACAT/REA2014/Rapport_REA2014.pdf

5. Lashéras A, Guisset O, Boulestreau H, Rogues A-M, Fiore M, Szajner S, et al. Réservoirs et transmission de Pseudomonas aeruginosa en réanimation médicale. Médecine Mal Infect. févr 2006;36(2):99-104.

6. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med. févr 2006;34(2):344-53.

7. Crouch Brewer S, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV. Ventilator-associated pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa. Chest. avr 1996;109(4):1019-29.

8. Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E, Wolff M, Tamm M, François B, et al. Pseudomonas aeruginosa serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. Crit Care [Internet]. 2014 [cité 15 mai 2016];18(1). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4057348/

9. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, et al. Role of flagella in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection. Infect Immun. janv 1998;66(1):43-51.

10. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA. Role of exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and architecture. Appl Environ Microbiol. août 2011;77(15):5238-46.

11. Faure E, Mear J-B, Faure K, Normand S, Couturier-Maillard A, Grandjean T, et al. Pseudomonas aeruginosa type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLRC4-coupled inflammasome. Am J Respir Crit Care Med. 1 avr 2014;189(7):799-811.

12. Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. Chest. juill 2002;122(1):262-8.

13. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative review of the carbapenems. Drugs. 2007;67(7):1027-52.

14. CASFM_EUCAST_V1_0_2014(1).pdf [Internet]. [cité 14 août 2016]. Disponible sur: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_0_2014(1).pdf

15. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 31 août 2000;406(6799):959-64.

16. Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. janv 1990;34(1):52-7.

17. Trias J, Dufresne J, Levesque RC, Nikaido H. Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. août 1989;33(8):1202-6.

18. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol. août 2010;300(6):371-9.

19. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect. 1 févr 2010;16(2):112-22.

20. Sun H-Y, Fujitani S, Quintiliani R, Yu VL. Pneumonia Due to Pseudomonas aeruginosa: Part II: Antimicrobial Resistance, Pharmacodynamic Concepts, and Antibiotic Therapy. Chest. mai 2011;139(5):1172-85.

21. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 16 mai 1980;289(1036):321-31.

22. Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. mai 2009;53(5):1766-71.

23. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. mai 1993;37(5):962-9.

24. Dalhoff A, Janjic N, Echols R. Redefining penems. Biochem Pharmacol. 30 mars 2006;71(7):1085-95.

25. Fera MT, Zummo S, DE Sarro A. In vitro activity studies of doripenem and two other carbapenems tested against Pseudomonas aeruginosa and other non-fermentative bacilli. J Chemother Florence Italy. déc 2011;23(6):335-40.

26. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of Serratia marcescens. Antimicrob Agents Chemother. avr 1995;39(4):824-9.

27. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC [Internet]. [cité 28 mai 2016]. Disponible sur: http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/

28. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β-lactamases. J Antimicrob Chemother. 1 juin 2005;55(6):1050-1.

29. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. avr 2001;45(4):1151-61.

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

31. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of Pseudomonas aeruginosa isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. avr 2007;51(4):1553-5.

32. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. J Antimicrob Chemother. mars 2002;49(3):561-5.

33. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. juill 1999;43(7):1584-90.

34. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. sept 2010;10(9):597-602.

35. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo-β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Serbia. Antimicrob Agents Chemother. août 2011;55(8):3929-31.

36. Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in P. aeruginosa isolates, located on a plasmid also found in A. baumannii. Pathol Biol (Paris). sept 2009;57(6):493-5.

37. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. oct 2011;55(10):4828-33.

38. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res. août 2010;10(4):441-51.

39. Peirano G, Lascols C, Hackel M, Hoban DJ, Pitout JDD. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae that produce VIMs and IMPs from the SMART surveillance program. Diagn Microbiol Infect Dis. mars 2014;78(3):277-81.

40. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. Surveillance and molecular epidemiology of Klebsiella pneumoniae isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. Antimicrob Agents Chemother. janv 2013;57(1):130-6.

41. Livermore DM. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. mars 2001;47(3):247-50.

42. Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Winokur PL, Gales AC, et al. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. sept 1999;29(3):595-607.

43. onerba-ra_2013-bd.pdf [Internet]. [cité 14 août 2016]. Disponible sur: http://www.onerba.org/IMG/pdf/onerba-ra_2013-bd.pdf

44. Lepper PM, Grusa E, Reichl H, Högel J, Trautmann M. Consumption of Imipenem Correlates with β-Lactam Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. sept 2002;46(9):2920-5.

45. Cavallo JD, Hocquet D, Plesiat P, Fabre R, Roussel-Delvallez M, GERPA (Groupe d'Etude de la Résistance de Pseudomonas aeruginosa aux antibiotiques). Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. J Antimicrob Chemother. mai 2007;59(5):1021-4.

46. Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al. Pseudomonas aeruginosa may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. oct 2007;51(10):3531-6.

47. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible Pseudomonas aeruginosa collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother. juill 2014;69(7):1804-14.

48. Furtado GHC, Bergamasco MD, Menezes FG, Marques D, Silva A, Perdiz LB, et al. Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa infection at a medical-surgical intensive care unit: risk factors and mortality. J Crit Care. déc 2009;24(4):625.e9-14.

49. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. janv 2006;50(1):43-8.

50. Wang CY, Jerng JS, Chen KY, Cheng KY, Lee LN, Yu CJ, et al. Pandrug-resistant Pseudomonas aeruginosa among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. janv 2006;12(1):63-8.

51. Mladenovic-Antic S, Kocic B, Velickovic-Radovanovic R, Dinic M, Petrovic J, Randjelovic G, et al. Correlation between antimicrobial consumption and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa in a hospital setting: a 10-year study. J Clin Pharm Ther. oct 2016;41(5):532-7.

52. Diago-Navarro E, Chen L, Passet V, Burack S, Ulacia-Hernando A, Kodiyanplakkal RP, et al. Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. J Infect Dis. 1 sept 2014;210(5):803-13.

53. Lautenbach E, Synnestvedt M, Weiner MG, Bilker WB, Vo L, Schein J, et al. Imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. Infect Control Hosp Epidemiol. janv 2010;31(1):47-53.

54. Zavascki AP, Barth AL, Gonçalves ALS, Moro ALD, Fernandes JF, Martins AF, et al. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial Pseudomonas aeruginosa infections. J Antimicrob Chemother. août 2006;58(2):387-92.

55. Shorr AF. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. Crit Care Med. avr 2009;37(4):1463-9.

56. Judd WR, Ratliff PD, Hickson RP, Stephens DM, Kennedy CA. Clinical and economic impact of meropenem resistance in Pseudomonas aeruginosa-infected patients. Am J Infect Control. 16 juin 2016;

57. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. août 2010;48(8):2999-3002.

58. Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. Antimicrob Agents Chemother. janv 2010;54(1):565-9.

59. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure J-A, Le P, Church DL. Detection of Pseudomonas aeruginosa producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. juill 2005;43(7):3129-35.

60. Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. J Clin Microbiol. juin 2008;46(6):2028-37.

61. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. PloS One. 2013;8(3):e60666.

62. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy. Antimicrob Agents Chemother. janv 2001;45(1):105-16.

63. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Pseudomonas spp. J Clin Microbiol. nov 2012;50(11):3773-6.

64. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. sept 2013;57(9):4578-80.

65. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 5 nov 1975;98(3):503-17.

66. Imamovic L, Sommer MOA. Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. Sci Transl Med. 25 sept 2013;5(204):204ra132.

67. Hu Y-F, Liu C-P, Wang N-Y, Shih S-C. In vitro antibacterial activity of rifampicin in combination with imipenem, meropenem and doripenem against multidrug-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. BMC Infect Dis. 2016;16(1):444.

68. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol. janv 2000;38(1):40-3.

69. Venier A-G, Leroyer C, Slekovec C, Talon D, Bertrand X, Parer S, et al. Risk factors for Pseudomonas aeruginosa acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. J Hosp Infect. oct 2014;88(2):103-8.

70. Fournier D, Garnier P, Jeannot K, Mille A, Gomez A-S, Plésiat P. A convenient method to screen for carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. nov 2013;51(11):3846-8.

71. Tan TY, Ng LSY, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis. Antimicrob Agents Chemother. janv 2009;53(1):146-9.

72. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. Gut Pathog. 19 mai 2014;6:13.

73. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in a low prevalence country. J Antimicrob Chemother. avr 2008;61(4):827-30.

74. Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X. Nationwide Investigation of Extended-Spectrum β-Lactamases, Metallo-β-Lactamases, and Extended-Spectrum Oxacillinases Produced by Ceftazidime-Resistant Pseudomonas aeruginosa Strains in France. Antimicrob Agents Chemother. août 2010;54(8):3512-5.

75. Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. août 2013;68(8):1772-80.

76. Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, Campo R del, Juan C, et al. Pseudomonas aeruginosa carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. J Antimicrob Chemother. 1 sept 2011;66(9):2022-7.

77. Azim A, Dwivedi M, Rao PB, Baronia AK, Singh RK, Prasad KN, et al. Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum beta-lactamase- and metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria--an Indian experience. J Med Microbiol. août 2010;59(Pt 8):955-60.

78. Li J, Zou M, Dou Q, Hu Y, Wang H, Yan Q, et al. Characterization of clinical extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa in the Hunan province of China. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2016;15(1):35.

79. Yi M, Wang P, Liu Y. Molecular typing and resistance mechanisms of carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from a Chinese surgical intensive care unit. Chin Med J (Engl). 2014;127(6):1071-6.

80. Kali A, Srirangaraj S, Kumar S, Divya HA, Kalyani A, Umadevi S. Detection of metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in intensive care units. Australas Med J. 2013;6(12):686-93.

81. Sistanizad M, Kouchek M, Miri M, Goharani R, Solouki M, Ayazkhoo L, et al. Carbapenem Restriction and its Effect on Bacterial Resistance in an Intensive Care unit of a Teaching Hospital. Iran J Pharm Res IJPR. 2013;12(3):503-9.

82. Saito R, Koyano S, Dorin M, Higurashi Y, Misawa Y, Nagano N, et al. Evaluation of a simple phenotypic method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods. janv 2015;108:45-8.

83. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-β-lactamases and KPC in Klebsiella pneumoniae with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. avr 2011;17(4):552-6.

84. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. J Antimicrob Chemother. août 2010;65(8):1664-71.

85. Peter S, Lacher A, Marschal M, Hölzl F, Buhl M, Autenrieth I, et al. Evaluation of phenotypic detection methods for metallo-β-lactamases (MBLs) in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. juill 2014;33(7):1133-41.

86. Pasteran F, Veliz O, Faccone D, Guerriero L, Rapoport M, Mendez T, et al. A simple test for the detection of KPC and metallo-β-lactamase carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. sept 2011;17(9):1438-41.

87. Schurek KN, Wiebe R, Karlowsky JA, Rubinstein E, Hoban DJ, Zhanel GG. Faropenem: review of a new oral penem. Expert Rev Anti Infect Ther. avr 2007;5(2):185-98.

88. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. sept 2012;18(9):1503-7.

89. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. juill 2012;50(7):2441-3.

90. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. J Clin Microbiol. juill 2015;53(7):2163-71.

91. De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, et al. Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime- resistant Pseudomonas aeruginosa isolated in a French hospital in 2000. Antimicrob Agents Chemother. sept 2002;46(9):3031-4.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.