



**HAL**  
open science

**Caractérisation phénotypique de souches  
d'entérobactéries produisant une oxacillinase-48 isolées  
lors d'une épidémie survenue au CHU de Nancy en  
2009/2011**

Claire Chassagne

► **To cite this version:**

Claire Chassagne. Caractérisation phénotypique de souches d'entérobactéries produisant une oxacillinase-48 isolées lors d'une épidémie survenue au CHU de Nancy en 2009/2011. Sciences pharmaceutiques. 2012. hal-01732689

**HAL Id: hal-01732689**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732689v1>**

Submitted on 14 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**2012**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le **Jeudi 18 octobre 2012**

Par **Claire CHASSAGNE**  
née le 11 mars 1984, à Limoges

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Caractérisation phénotypique de souches**  
**d'entérobactéries produisant une oxacillinase-48**  
**isolées lors d'une épidémie survenue**  
**au CHU de Nancy en 2009/2011.**

---

**Membres du Jury**

Président :

M. le Professeur Christophe GANTZER, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges :

M. le Professeur Alain LOZNIIEWSKI, PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy (Directeur de thèse)

M. le Docteur Tahar HADOU, PH, Laboratoire de Bactériologie, CHU de Nancy

Mlle le Docteur Hélène HOCHARD, PHC, Laboratoire de Microbiologie, CHR Metz-Thionville

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2011-2012**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement  
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Bertrand RIHN

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON  
Gérard SIEST  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY  
Pierre DIXNEUF  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Thérèse GIRARD  
Maurice HOFFMANN  
Michel JACQUE  
Lucien LALLOZ  
Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
François MORTIER  
Maurice PIERFITTE  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT  
Gérald CATAU  
Jean-Claude CHEVIN  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Jean-Louis MONAL  
Dominique NOTTER  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

## **ENSEIGNANTS**

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	<i>Chimie analytique et bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	<i>Pharmacologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

Béatrice DEMORE	<i>Pharmacie clinique</i>
Nathalie THILLY	<i>Santé publique</i>

### **MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	<i>Communication et santé</i>
Isabelle BERTRAND	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	<i>Pharmacie galénique</i>
Joël DUCOURNEAU	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCA Y	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	<i>Microbiologie</i>
Béatrice FAIVRE	<i>Hématologie</i>
Adil FAIZ	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Luc FERRARI	<i>Toxicologie</i>
Caroline GAUCHER-DI STASIO	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	<i>Pharmacie clinique</i>

Thierry HUMBERT  
Frédéric JORAND  
Olivier JOUBERT  
Francine KEDZIEREWICZ  
Alexandrine LAMBERT  
Faten MERHI-SOUSSI  
Christophe MERLIN  
Blandine MOREAU  
Maxime MOURER  
Francine PAULUS  
Christine PERDICAKIS  
Caroline PERRIN-SARRADO  
Virginie PICHON  
Anne SAPIN-MINET  
Marie-Paule SAUDER  
Gabriel TROCKLE  
Mihayl VARBANOV  
Marie-Noëlle VAULTIER  
Emilie VELOT  
Mohamed ZAIOU  
Colette ZINUTTI

***PROFESSEUR ASSOCIE***

Anne MAHEUT-BOSSER

***PROFESSEUR AGREGE***

Christophe COCHAUD

*Chimie organique*  
*Environnement et Santé*  
*Toxicologie*  
*Pharmacie galénique*  
*Informatique, Biostatistiques*  
*Hématologie*  
*Microbiologie*  
*Pharmacognosie*  
*Chimie organique*  
*Informatique*  
*Chimie organique*  
*Pharmacologie*  
*Biophysique*  
*Pharmacie galénique*  
*Mycologie, Botanique*  
*Pharmacologie*  
*Immuno-Virologie*  
*Mycologie, Botanique*  
*Physiologie-Physiopathologie humaines*  
*Biochimie et Biologie moléculaire*  
*Pharmacie galénique*

*Sémiologie*

*Anglais*

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

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

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

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

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES  
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».



# Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres de ce jury qui ont accepté de juger mon travail :

Merci à Monsieur le Professeur Christophe Gantzer de me faire l'honneur de présider ce jury.

Merci à Monsieur le Professeur Alain Lozniewski de m'avoir accueillie dans son laboratoire lors de mon parcours d'interne et de m'avoir dirigée, guidée et accompagnée tout au long de ce travail.

Merci à Monsieur le Docteur Tahar Hadou de m'avoir transmis sa passion pour la bactériologie, pour son aide dans ma formation et sa présence au sein de ce jury.

Merci à Mademoiselle le Docteur Hélène Hochard pour m'avoir encouragé dans ce travail et pour cette grande première pour toi !

Egalement un grand merci à tous ceux qui comptent pour moi :

A mes parents, ma sœur, ma famille et mes amis,

A Psycka pour avoir relu ma thèse,

A Jérôme pour m'avoir supportée, soutenue, encouragée et pour ce qu'il est...

# Sommaire

Liste des abréviations

I – Introduction.....	1
II- Généralités et contexte.....	2
II.1. La résistance aux antibiotiques.....	2
II.2. Les $\beta$ -lactamases.....	5
II.2.1. Les $\beta$ -lactamines : cibles des $\beta$ -lactamases.....	6
II.2.1.1. Classification .....	6
II.2.1.2. Les $\beta$ -lactamines : un développement sous la contrainte .....	10
II.2.2. Les $\beta$ -lactamases : classification et diversité des enzymes produites par les entérobactéries.....	12
II.2.2.1. Classification.....	12
II.2.2.2. Les $\beta$ -lactamases produites par les entérobactéries (selon la classification d’Ambler).....	13
II.2.2.2.1. Enzymes de classe A.....	13
II.2.2.2.2. Enzymes de classe B.....	17
II.2.2.2.3. Enzymes de classe C.....	18
II.2.2.2.4. Enzymes de classe D.....	19
II.3. Les carbapénémases chez les entérobactéries.....	21
II.3.1. Carbapénémases et résistance aux carbapénèmes (et autres $\beta$ -lactamines).....	21
II.3.2. Carbapénémases : aspects épidémiologiques.....	24
II.3.3. Oxacillinase-48 (OXA-48).....	28
II.3.4. Détection phénotypique des carbapénémases.....	33
II.3.4.1. Détection des souches productrices de carbapénémases parmi les isolats responsables d’infections.....	34
II.3.4.1.1. Test de Hodge modifié (MHT).....	36
II.3.4.1.2. Tests d’inhibition (ou de synergie).....	38
II.3.4.1.3. Méthodes spectrophotométriques.....	42
II.3.4.2. Dépistage des porteurs de souches productrices de carbapénémase.....	44

III – Caractérisation phénotypique des souches isolées lors de l'épidémie OXA-48 au CHU de Nancy en 2009/2011.....	48
III.1. Objectif.....	48
III.2. Matériels et Méthodes.....	48
III.2.1 Souches.....	48
III.2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par différentes méthodes phénotypiques.....	50
III.2.2.1. Préparation de l'inoculum.....	50
III.2.2.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques à l'aide du système Vitek2® (bioMérieux) (logiciel 04.02).....	51
III.2.2.3. Etude de la sensibilité aux carbapénèmes par la méthode de diffusion en gélose avec les bandelettes E-test®.....	51
III.2.2.4. Etude de la sensibilité aux carbapénèmes par la méthode de diffusion en gélose avec les disques.....	51
III.2.2.5. Interprétation des résultats.....	52
III.3. Résultats.....	53
III.3.1. Sensibilité aux carbapénèmes.....	53
III.3.1.1. Comparaison des CMI obtenues pour les souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 grâce au système Vitek2® (logiciel 04.02) : travail expérimental versus analyses de routine.....	53
III.3.1.2. Comparaison des CMI obtenues par la méthode des E-tests®.....	55
III.3.1.2.1. Souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48.....	56
III.3.1.2.2. Autres espèces d'entérobactéries OXA-48.....	61
III.3.1.3. Comparaison des diamètres d'inhibition obtenus par la méthode avec les disques.....	62
III.3.1.3.1. Souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48.....	63
III.3.1.3.2. Autres espèces d'entérobactéries OXA-48.....	67
III.3.1.4. Synthèse.....	68
III.3.2. Résistances associées.....	72
IV – Discussion.....	75
IV.1. Travail expérimental.....	75
IV.1.1. Méthode semi-automatisée (Vitek2®, logiciel 04.02).....	75
IV.1.2. Méthodes manuelles de diffusion en gélose avec les bandelettes E-test® et avec les disques.....	77
IV.1.3. Synthèse.....	81

IV.2. Perspectives plus générales.....	83
IV.2.1. Place des méthodes phénotypiques pour la détection des carbapénémases, incluant celles de type OXA-48.....	83
IV.2.2. Carbapénémases et OXA-48 : problème de santé publique.....	86
IV.2.2.1. Aspect thérapeutique.....	87
IV.2.2.2. Aspect épidémiologique, mesures d'hygiène.....	89
V – Conclusion.....	91
Références bibliographiques.....	96
Liste des Figures.....	108
Liste des Tableaux.....	110
Résumé	

## Liste des abréviations

A : amikacine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMC : amoxicilline – acide clavulanique

AMX : amoxicilline

ARS : Agence Régionale de Santé

AST : Antibiotic Susceptibility Testing

ATCC : American Type Culture Collection

ATM : aztréonam

BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu

BMR : Bactérie Multi-Résistante

BO : acide boronique

C1G : céphalosporine de 1<sup>ère</sup> génération

C2G : céphalosporine de 2<sup>ème</sup> génération

C3G : céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

C4G : céphalosporine de 4<sup>ème</sup> génération

C5G : céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CAZ : ceftazidime

CClin : Centre de Coordination de lutte contre les infections nosocomiales

CH : Centre Hospitalier

CHDLs : “Carbapenems Hydrolysing Classe D  $\beta$ -lactamases” =  $\beta$ -lactamase de classe D hydrolysant les carbapénèmes

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CHUN : Centre Hospitalier Universitaire de Nancy

CIP : ciprofloxacine

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNQ : Contrôle National Qualité

CNR : Centre National de Référence

CTX : céfotaxime

DP : acide dipicolinique  
EBLSE : entérobactérie productrice de BLSE  
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique  
EPC : entérobactérie productrice de carbapénémase  
EHPAD : Etablissement d'Hébergement pour Personnes Âgées Dépendantes  
ERT : ertapénème  
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
FT : nitrofurantoïne  
G : gentamicine  
HCSP : Haut Conseil de la santé publique  
I : Intermédiaire  
IBL : Inhibiteur de  $\beta$ -lactamase  
IMP : imipénème  
InVS : Institut de Veille Sanitaire  
IS : séquence d'insertion  
MBL : Métallo- $\beta$ -Lactamase  
McF : MacFarland  
MER : méropénème  
MH : Mueller Hinton  
MHT : Test de Hodge Modifié  
N : nétilmicine  
NaCl : Chlorure de sodium  
ND : non déterminé  
ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques  
OXA-48 : oxacillinase-48  
PLP : Protéines Liant les Pénicillines  
R : Résistant  
S : Sensible  
SXT : sulfaméthoxazole – triméthoprim  
T : tobramycine  
Tn : transposon  
TRI : TEM Résistante aux Inhibiteurs  
TZP : pipéracilline – tazobactam

## I – Introduction

L'émergence d'entérobactéries résistantes à de multiples antibiotiques incluant les  $\beta$ -lactamines, qui comptent parmi les molécules les plus prescrites, en particulier à l'hôpital, est devenue un problème crucial de santé publique. Au fur et à mesure du développement et de l'utilisation de nouvelles  $\beta$ -lactamines, des microorganismes produisant des enzymes hydrolysant ces molécules ( $\beta$ -lactamases) ont émergé. Ainsi, sont apparues des entérobactéries produisant des  $\beta$ -lactamases au spectre de plus en plus large (i.e. inactivant un nombre de plus en plus important de classes de  $\beta$ -lactamines), comme en particulier les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et plus récemment les carbapénémases. En cas d'infection due à ces microorganismes, les limites, voire les impasses thérapeutiques résultant de la résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux autres antibiotiques, soulignent l'importance qu'il y a à prévenir, limiter et contrôler la diffusion de ces bactéries. L'étape préalable à la prise de ces mesures est la connaissance, puis la détection de ces microorganismes. Malheureusement, cette détection peut être rendue difficile, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de résistance qui s'accumulent au sein d'un même microorganisme et en raison de la variabilité de l'expression des facteurs de résistance correspondants. La détection phénotypique des mécanismes en cause est donc de plus en plus complexe d'autant qu'une même résistance peut être due à différents mécanismes, associés ou non entre eux. Ceci rend donc difficile la tâche d'un laboratoire de biologie médicale qui ne dispose le plus souvent que d'un nombre restreint de méthodes phénotypiques. Parmi les nombreux défis à relever dans ce contexte, il en est un qui semble majeur à ce jour : il s'agit de la résistance des bacilles Gram négatif, et en particulier des entérobactéries, aux carbapénèmes. Cette résistance, qui peut être due à la production de carbapénémases, mais aussi à d'autres mécanismes de résistance, peut également affecter de manière variable les différents carbapénèmes et être parfois difficile à détecter. Il en va ainsi des souches d'entérobactéries produisant une oxacillinase-48 (OXA-48) qui ont depuis peu émergé de par le monde et ont récemment été à l'origine d'un phénomène épidémique au CHU de Nancy.

Dans ce contexte, il nous a paru pertinent d'étudier à l'aide de méthodes disponibles en routine les caractéristiques phénotypiques de l'ensemble des souches, isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy durant l'épidémie de 2009/2011, produisant une OXA-48.

Après quelques rappels concernant la résistance aux antibiotiques et plus particulièrement celle associée à la production de carbapénémases dont OXA-48, nous ferons un point sur les méthodes de détection phénotypique des souches produisant ces enzymes. Nous présenterons ensuite, après avoir explicité l'objectif de l'étude et décrit le travail expérimental, les résultats obtenus. Enfin, nous discuterons, à la lueur de ces résultats, la place des différentes méthodes de détection phénotypique dans un laboratoire de routine.

## **II- Généralités et contexte**

### **II.1. La résistance aux antibiotiques**

La résistance des bactéries aux antibiotiques survient au hasard par des mécanismes qui sont sans doute hérités de la compétition naturelle entre microorganismes. C'est un fait inhérent à leur mode de fonctionnement qui leur permet de s'adapter à leur environnement. Les mécanismes de résistance aident les bactéries dans leur compétition pour les niches écologiques; ils sont donc des éléments fondamentaux de la vie microbienne et représentent des phénomènes évolutifs normaux.

Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques existent et peuvent être associés : imperméabilité, porines anormales ou pertes de porines, efflux, inactivation enzymatique séquestration, défaut d'activation et/ou cible absente, modifiée ou protégée. Le mécanisme de résistance le plus répandu dans le monde bactérien reste l'inactivation enzymatique des antibiotiques. Les bactéries vont inactiver l'antibiotique de manière partielle ou totale et le rendre inefficace. En effet, l'antibiotique va être modifié ou hydrolysé par une enzyme bactérienne. Parmi les enzymes les plus fréquemment rencontrées (chez de nombreuses bactéries Gram positif ou Gram négatif), on trouve les enzymes inactivant les aminosides ainsi que les enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines ( $\beta$ -lactamases).

Les différents mécanismes précités peuvent être à l'origine d'une résistance aux antibiotiques naturelle ou acquise.



Une résistance naturelle est une caractéristique propre à toutes les souches qui appartiennent à un groupe bactérien donné qui peut correspondre, selon les molécules, à une espèce (ex : *Staphylococcus saprophyticus* et fosfomycine) ou à un groupe phylogénétique plus ou moins vaste (ex : genre *Enterococcus* et céphalosporines, bactéries anaérobies et aminosides, bactéries Gram négatif et glycopeptides). Le support génétique de cette résistance est chromosomique et de ce fait toujours transmissible à la descendance (transmission verticale). La résistance naturelle préexiste à l'introduction des antibiotiques : on l'appelle encore résistance innée. Elle permet donc de définir le phénotype sauvage de l'espèce. C'est une résistance connue et prévisible, qui peut aider à l'identification d'une espèce.

La résistance acquise, quant à elle, apparaît chez certaines souches au sein d'une espèce normalement sensible (ex : souche de *Staphylococcus aureus* devenue résistante à la méticilline). Cette résistance résulte de modifications génétiques secondaires à des mutations de gènes endogènes ou à l'acquisition de gènes exogènes. La transmission peut donc être verticale ou horizontale.

Les mutations peuvent affecter les gènes codant les cibles des antibiotiques ou des facteurs contribuant à la bonne diffusion intra-cellulaire de ces molécules ou à leur activation lorsque celle-ci s'avère nécessaire. Ces mutations peuvent aussi affecter d'autres gènes, comme ceux codant des facteurs de régulation contrôlant l'expression de gènes codant des facteurs de résistance. Ces mutations peuvent également contribuer à modifier un gène de résistance préalablement acquis et ainsi conduire par exemple à une résistance de spectre plus élargi (ex : mutation des gènes codant des pénicillinases de type TEM ayant contribué à l'apparition de mutants produisant des BLSE de type TEM). La résistance acquise par mutation aboutit, sous réserve de la viabilité et du « fitness » des mutants, à l'émergence de ces derniers essentiellement par transmission verticale.

L'acquisition de gènes de résistance exogènes peut être le fruit de transferts par transformation, transduction ou conjugaison.

La transformation correspond à une acquisition par des bactéries, qui en ont la capacité (bactéries compétentes), de capter de l'ADN nu et de l'intégrer par recombinaison entre

régions homologues dans leur génome. Le fait que ce phénomène ne puisse se produire qu'entre bactéries phylogénétiquement très proches et que peu d'espèces bactériennes ne soient naturellement compétentes limite l'influence de la transformation en termes de diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques à certaines espèces (ex : résistance des streptocoques aux  $\beta$ -lactamines).

A l'inverse, l'acquisition de gènes de résistance exogènes, via des éléments génétiques mobiles, comme les plasmides, est beaucoup plus fréquente. Les plasmides, qui sont des molécules d'ADN double brin, de structure en général circulaire et de taille variable (1 à plus de 200 kb) peuvent posséder un ou plusieurs gènes de résistance et jouent de ce fait un rôle important dans la diffusion de ces gènes. Si certains plasmides peuvent être mobilisables par d'autres éléments génétiques mobiles ou être transférés par des bactériophages (transduction), la plupart d'entre eux sont autotransférables. Dans ce cas, les fonctions de transfert sont codées par des gènes plasmidiques. Ainsi, les plasmides conjugatifs possèdent au minimum une origine de réplication et tous les gènes nécessaires à la synthèse des pili sexuels et au transfert par conjugaison. Les plasmides peuvent aussi s'incorporer dans les chromosomes (voire s'en extraire ultérieurement de manière plus ou moins partielle et en emportant ou non avec eux des séquences d'ADN chromosomiques) ou se co-agréger entre eux. Les plasmides sont donc des éléments fortement contributifs à la dynamique génomique et par ce biais, à la dynamique des gènes de résistance aux antibiotiques portés par ces plasmides.

Les transposons (Tn) sont d'autres éléments génétiques mobiles, capables de « sauter » (transposition) d'un plasmide vers un chromosome et vice et versa. Ces éléments possèdent des gènes codant des facteurs assurant la transposition (transposase seule ou associée à une résolvasse) ainsi que des séquences terminales souvent répétées inversées ou directes. Les plus petits éléments transposables codent uniquement la transposase et sont appelés séquences d'insertion (ou IS pour « insertion sequences »). Les transposons composites sont des structures transposables caractérisées par la présence de deux IS encadrant d'autres gènes, comme en particulier des gènes de résistance aux antibiotiques. D'autres transposons, de structure plus complexe, existent également. Il est à souligner que certains transposons peuvent contenir des structures appelées intégrons, capables d'intégrer des gènes cassettes et de les faire s'exprimer à partir d'un seul promoteur. En dehors des transposons dits conjugatifs, les transposons ne sont pas transférables *per se* et doivent pour

pouvoir être transférés s'intégrer au sein d'un réplicon, en général un plasmide, qui lui-même sera l'objet du transfert.

Les gènes de résistance peuvent apparaître chez la plupart des bactéries, mais la sélection de la résistance se produit le plus souvent chez des microorganismes habituellement non pathogènes, qui constituent la majorité du monde microbien. Les bactéries faisant partie des microbiotes présents chez l'Homme et les animaux, ainsi que celles de l'environnement, sont de ce fait des sources importantes de résistance.

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques peut être favorisée par l'utilisation, appropriée ou non, de ces molécules. Même si la résistance aux antibiotiques est un phénomène qui existait avant l'usage par l'Homme de ces molécules, ce phénomène n'a cessé d'évoluer au fur et à mesure des années, en particulier avec l'évolution croissante de l'usage des antibiotiques et la découverte de nouvelles molécules. L'accumulation des mécanismes de résistance a contribué à l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR), hautement résistantes (BHR) voire, à l'extrême, toto-résistantes. Si une souche bactérienne donnée peut ainsi devenir de plus en plus résistante aux antibiotiques, il est également possible qu'elle soit à l'origine de la diffusion de gènes codant des facteurs de résistance à des souches appartenant à la même espèce ou à des espèces phylogénétiquement proches ou éloignées. Ces échanges génétiques sont favorisés au sein des microbiotes, notamment au sein du microbiote intestinal. En effet, ces phénomènes intéressent particulièrement les entérobactéries qui constituent une fraction importante de la flore intestinale non anaérobie stricte de l'Homme et des animaux. Ces microorganismes peuvent se transmettre directement ou indirectement entre individus. Lorsque cette transmission concerne des bactéries résistantes aux antibiotiques, elle contribue à leur dissémination et de ce fait à la diffusion de la résistance aux antibiotiques. Ce phénomène, qui est particulièrement favorisé en milieu hospitalier, peut également survenir en milieu communautaire.

## **II.2. Les $\beta$ -lactamases**

Les  $\beta$ -lactamases sont les enzymes d'inactivation les plus fréquemment rencontrées et constituent le principal mécanisme de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines ; elles ont pour

substrat une  $\beta$ -lactamine et hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame en clivant le lien amine de l'antibiotique (Figure 1). Elles agissent par l'intermédiaire d'un ester de sérine ou d'un mécanisme dépendant de l'ion zinc  $Zn^{2+}$  [Muller 2004].

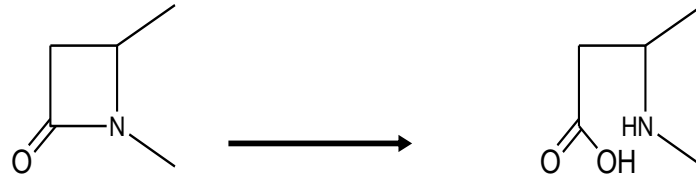


Figure 1 : Hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame

## II.2.1. Les $\beta$ -lactamines : cibles des $\beta$ -lactamases

### II.2.1.1. Classification

Cette famille d'antibiotiques comprend un très grand nombre de molécules qui comptent parmi elles les premiers antibiotiques utilisés en médecine. Les  $\beta$ -lactamines représentent également les antibiotiques les plus utilisés en ville et à l'hôpital. Leur structure moléculaire de base est le noyau  $\beta$ -lactame associé à un cycle thiazolidine (commun aux pénicillines) ou dihydrothiazine (commun aux céphalosporines). Cette famille inclut les dérivés de la pénicilline (ou pénames), les céphalosporines (céphèmes), les monobactames ( $\beta$ -lactamines monocycliques), les carbapénèmes et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (IBL) (Figures 2 et 3). Ces molécules ont un spectre d'activité plus ou moins large et agissent sur les bactéries en phase de multiplication en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP), enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane (PG).

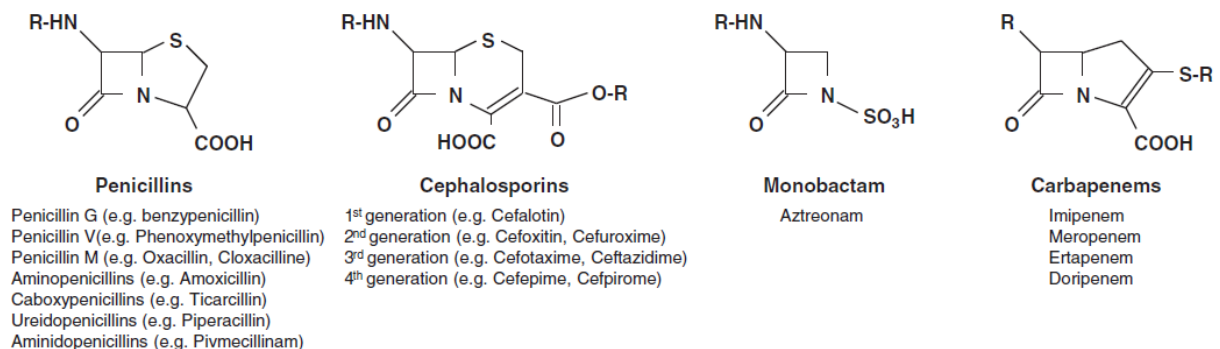


Figure 2 : Structure moléculaire des  $\beta$ -lactamines [Nordmann *et al.* 2012]

L'obtention des  $\beta$ -lactamines, d'abord par extraction, puis de plus en plus par hémisynthèse ou synthèse, a permis de contrecarrer l'apparition progressive de la résistance aux  $\beta$ -lactamines, en grande partie due à l'émergence, au sein des isolats responsables d'infections humaines, de nouvelles  $\beta$ -lactamases dont le spectre d'activité s'élargissait. Les  $\beta$ -lactamines représentent donc à ce jour une des familles d'antibiotiques les plus diversifiés.

- ***Pénicillines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases***

Au sein des pénicillines, après l'avènement des pénicillines naturelles au spectre d'action moyen (pénicilline G et la pénicilline V), des molécules de spectre étroit, mais néanmoins plus actives sur certaines bactéries (Ex : pénicillines M, actives sur les staphylocoques devenus résistants à la pénicilline G par production de pénicillinase), ou de spectre plus large (aminopénicillines, puis uréidopénicillines et carboxypénicillines), ont été progressivement mises à la disposition du thérapeute (Tableau 1).

### PENICILLINES

Pénicilline G, V (1944)	benzathine benzylpénicilline
Pénicilline A : Amino-pénicillines	amoxicilline ampicilline
Carboxy-pénicillines	ticarcilline
Uréido-pénicilline	pipéracilline
Amidino-pénicillines	pivmécillinam
Pénicilline M	oxacilline cloxacilline mécilline

### INHIBITEURS de $\beta$ -LACTAMASES = IBL

associé à l'amoxicilline	acide clavulanique
associé à la ticarcilline	acide clavulanique
associé à l'ampicilline	sulbactam
associé à la pipéracilline	tazobactam

Tableau 1 : Principales pénicillines associées ou non avec un IBL

Le développement d'associations combinant une pénicilline à un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases (IBL) a également contribué à gagner du temps face à l'émergence de nouvelles résistances. En effet, ces IBL (Figure 3), qui ont une activité antibactérienne intrinsèque, permettent surtout, de par leur propriété de molécules « suicides », de préserver, de manière cependant variable selon le type d'IBL et de  $\beta$ -lactamases, l'activité de la pénicilline qui leur est associée en présence de pénicillinases, voire de BLSE.

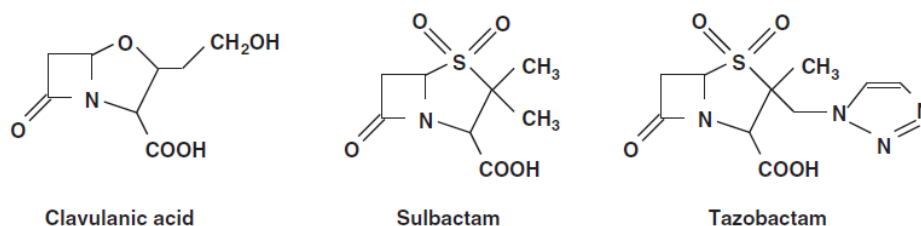


Figure 3 : Structure moléculaire des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases [Nordmann *et al.* 2012]

- **Céphalosporines**

Parmi les différentes classes de  $\beta$ -lactamines, l'évolution la plus importante, en termes de nombres de molécules commercialisées, a été observée pour les céphalosporines (Tableau 2).

### CEPHALOSPORINES

Céphalosporines de 1 <sup>ère</sup> génération = C1G	céfalotine céfalexine céfazoline
Céphalosporines de 2 <sup>ème</sup> génération = C2G	céfuroxime axétil céfamandole
Céphamycines	céfoxitine céfotétan latamoxef
Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération = C3G	cefsulodine céfixime cefpodoxime proxétil ceftriaxone céfotaxime ceftazidime
Céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération = C4G	céfépime cefprome
Céphalosporines de 5 <sup>ème</sup> génération = C5G	ceftaroline fosamil

Tableau 2 : Principales céphalosporines

Le point de départ de ce développement a été l'isolement, dans les années 40, de la céphalosporine C, produite par *Cephalosporium acremonium*, suivi de l'obtention, après hydrolyse de cette molécule, de l'acide 7-aminocéphalosporanique, à partir duquel les nouvelles céphalosporines ont été obtenues par héli-synthèse [Cattoir 2008]. La classification des céphalosporines la plus usitée est celle correspondant aux différentes générations (1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>) reflétant globalement, bien que de manière imparfaite (certaines céphalosporines plus récentes que d'autres ont été classées dans une génération antérieure), le développement au fil du temps de molécules de spectres différents et ayant une capacité d'hydrolyse plus marquée vis-à-vis des  $\beta$ -lactamases (Ex : céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération actives sur des souches produisant des pénicillinases à haut niveau ; céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération actives sur des souches produisant des céphalosporinases à haut niveau) voire encore actives malgré la présence de PLP anormales (Ex : céphalosporines de 5<sup>ème</sup> génération actives sur des souches de staphylocoques résistants à la méticilline) [Nordmann *et al.* 2010].

- ***Monobactames***

Les monobactames représentent une classe comprenant des molécules initialement obtenues à partir de bactéries, puis produites par synthèse chimique, dont le spectre est étroit, limité à certains bacilles Gram négatif (entérobactéries, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ...) et certains cocci Gram négatif. La seule molécule utilisée à l'heure actuelle est l'aztréonam (ATM). Cette molécule, résistante à l'hydrolyse des pénicillinases et sensible à celle des céphalosporinases à haut niveau et des BLSE, a cependant la particularité de n'être pas non plus affectée par un grand nombre de carbapénémases.

- ***Carbapénèmes***

Les carbapénèmes, dont le cycle de base diffère de celui des pénicillines par la présence d'une double liaison et d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1, ont été commercialisés dans les années 90. Ces molécules exercent un effet bactéricide temps-dépendant et ont, pour la plupart, un très large spectre d'activité *in vitro* contre les bactéries Gram positif et Gram négatif, aérobies et anaérobies. Elles possèdent toutes une grande

stabilité vis-à-vis de la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamases [Cattoir *et al.* 2009], mais sont en revanche toutes inefficaces sur *Stenotrophomonas maltophilia* (production naturelle de MBL). L'un des premiers carbapénèmes commercialisés est l'imipénème, dérivé stable de la thiénamycine isolée en 1979 [Nordmann *et al.* 2010], elle-même obtenue à partir de *Streptomyces catleya*. L'imipénème, molécule de très large spectre d'activité, n'est pas hydrolysé par les pénicillinases, céphalosporinases et BLSE. Ce carbapénème a été commercialisé en 1986 sous le nom de Tiénam<sup>®</sup> où il est associé à la cilastatine, pour éviter à la fois sa dégradation par la deshydropeptidase des tubules rénaux proximaux et pour lutter, d'autre part, contre la néphrotoxicité naturelle de cette molécule en elle-même [Wolff *et al.* 2009]. Depuis d'autres carbapénèmes ont été commercialisés, de spectre plus ou moins large. Le méropénème apparu en 1997 (Méronem<sup>®</sup>) et le doripénème en mars 2009 (Doribax<sup>®</sup>) ont un spectre également très large et une activité *in vitro* augmentée sur les bacilles Gram négatif (par des modifications de substituant en position 2 par rapport à l'imipénème) [Wolff *et al.* 2009]. L'ertapénème commercialisé en 2002 (Invanz<sup>®</sup>) a un spectre plus restreint (entérobactéries) ; par exemple, son activité sur *P. aeruginosa*, et *Acinetobacter baumannii* est trop limitée pour une utilisation clinique [Grall *et al.* 2011]. Ce carbapénème possède en outre une demi-vie plus longue permettant une administration quotidienne, un volume de distribution très élevé et se distingue des autres molécules par une forte liaison aux protéines et une élimination urinaire pour 44% seulement sous forme inchangée [Wolff *et al.* 2009].

### **II.2.1.2. Les $\beta$ -lactamines : un développement sous la contrainte**

L'utilisation croissante des pénicillines a cependant conduit à l'émergence de souches produisant des pénicillinases, alors que l'utilisation des pénicillines associées à des IBL a notamment contribué à l'émergence de souches d'entérobactéries produisant des pénicillinases devenues résistantes aux IBL (Ex : pénicillinases de type TEM devenues Résistantes aux Inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases = TRI).



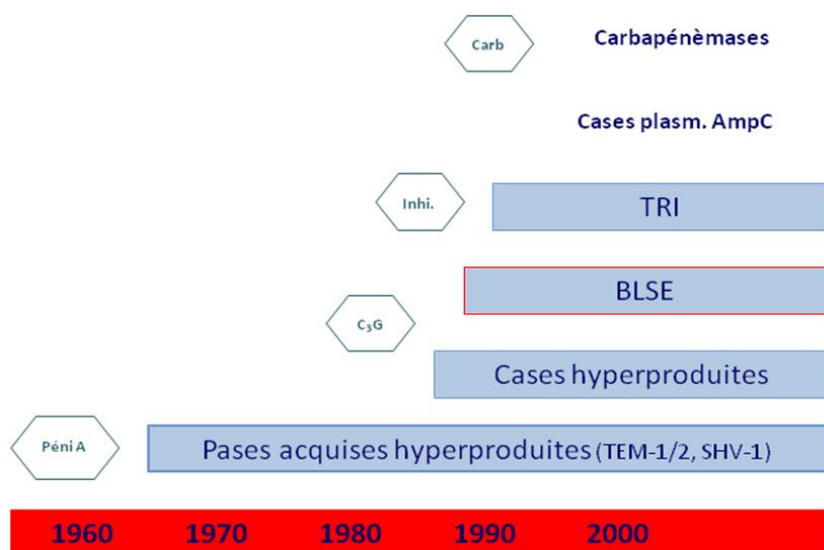


Figure 4 : Représentation schématique de « la course en avant » des  $\beta$ -lactamases sous la pression des antibiotiques (selon Roland Leclercq)

L'usage immodéré de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, apparues dans les années 80, a notamment conduit à l'émergence de souches d'entérobactéries résistantes à ces molécules par production à haut niveau de céphalosporinases, mais aussi par production de BLSE. Ainsi, dans le traitement des infections dues à des bacilles Gram négatif, et en particulier à des entérobactéries, les carbapénèmes sont progressivement apparus comme des molécules de recours, en quelque sorte des molécules de « dernière ligne » (Figure 4) [Arlet *et al.* 2003, Philippon *et al.* 2005].

Hélas, l'émergence de souches résistantes aux carbapénèmes est d'actualité et souligne l'importance qu'il y a, d'une part, à en contrôler l'évolution et celle de développer, d'autre part, de nouvelles molécules notamment actives sur des souches produisant des enzymes (carbapénémases) capables d'hydrolyser les carbapénèmes. Le développement de nouvelles molécules actives sur ce type de microorganismes n'est cependant pas, du moins à l'heure actuelle, à la hauteur des attentes du thérapeute. En effet, le plus grand nombre de molécules antibiotiques récemment commercialisées ont permis de faire face à des bactéries Gram positif et non à l'émergence des bactéries Gram négatif multi-, voire hautement résistantes.

Dans ce contexte, il est à souligner que la ceftaroline, qui est une céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération (prodrogue : ceftaroline fosamil - Teflaro<sup>®</sup>), non encore disponible en France

et active sur les staphylocoques résistants à la méticilline, présente une certaine activité vis-à-vis des entérobactéries productrices de BLSE. Son efficacité thérapeutique pour traiter des patients ayant une infection due à ce type de bactéries reste cependant à démontrer [Jorgenson *et al.* 2012].

Un nouvel IBL (Figure 5) qui, contrairement aux autres inhibiteurs classiques n'appartient pas à la famille des  $\beta$ -lactamines, le NXL104 (Novoxel<sup>®</sup>), a également été développé. Il a été montré que l'association ceftazidime/NXL104 est très active sur les entérobactéries, avec des CMI généralement inférieures à 1 mg/L, même en présence de BLSE (y compris CTX-M), céphalosporinase hyperproduite (avec ou sans imperméabilité) ou de carbapénémases de type KPC ou OXA-48 [Cattoir 2011].

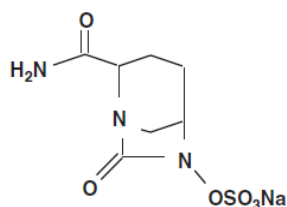


Figure 5 : Structure moléculaire du NXL104 [Nordmann *et al.* 2012]

## **II.2.2. Les $\beta$ -lactamases : classification et diversité des enzymes produites par les entérobactéries**

### **II.2.2.1. Classification**

Comme nous l'avons vu précédemment, les  $\beta$ -lactamases hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame en clivant le lien amine des  $\beta$ -lactamines. En fonction du substrat hydrolysé, on les appelle donc les pénicillinases, les céphalosporinases, les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou encore les carbapénémases.

Ces enzymes, dont le support génétique peut être chromosomique ou plasmidique, sont retrouvées chez de nombreuses bactéries (Gram positif et Gram négatif), soit

naturellement, soit au décours de l'acquisition de gènes de résistance. Leur expression peut être inductible ou constitutive. Il s'agit de protéines de structure (poids moléculaire, composition en acides aminés, point isoélectrique, structure du site actif) et de propriétés catalytiques (spectre d'activité sur les différentes  $\beta$ -lactamines hydrolysées, sensibilité ou résistance aux inhibiteurs) très diverses.

Il existe différentes classifications des  $\beta$ -lactamases : classification structurale d'Ambler, classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros... La plus utilisée en pratique courante médicale est actuellement celle d'Ambler. Cette classification est fondée sur l'homologie de séquence des acides aminés des  $\beta$ -lactamases. Elle divise ces enzymes d'inactivation en quatre groupes (A à D) selon la structure primaire de l'enzyme. Les enzymes des classes A, C et D sont dites à sérine active (type sérine), alors que la classe B regroupe les métallo- $\beta$ -lactamases (type métallo-enzymes), qui ont besoin d'ions  $Zn^{2+}$  [Philippon *et al.* 2005].

## **II.2.2.2. Les $\beta$ -lactamases produites par les entérobactéries (selon la classification d'Ambler)**

### **II.2.2.2.1. Enzymes de classe A**

Au sein des enzymes de classe A, une grande diversité fonctionnelle est observée : pénicillinases à spectre restreint ou à large spectre, BLSE, TEM résistantes aux inhibiteurs, carbénicillinases, céfuroximes et carbapénémases. Ces enzymes de classe A sont caractérisées par une résistance variable aux pénicillines et parfois aux céphalosporines voire même aux monobactames ; elles peuvent être sensibles aux céphamycines et aux carbapénèmes. Leur activité est inhibée de manière cependant variable par les IBL (sauf TEM résistantes aux IBL). Le support peut être chromosomique ou plasmidique et on en distingue plusieurs groupes selon leur substrat préférentiel [Bonnet 2011] (Tableau 3).

	Pénicilline G	Carboxypénicilline	C1G	C3G	ATM	IMP
Pénicillinasés à spectre restreint	+++	++	+/-	-	-	-
Pénicillinasés à spectre large	+++	++	++	-	-	-
BLSE	+++	++	++	++	++	-
Pénicillinasés résistantes aux inhibiteurs	+++	++	+/-	-	-	-
Carbénicillininasés	++	+++	+	-	-	-
Céfuroximasés	++	++	++	+	-	-
Carbapénémases	++	+	+	+	++	++

Tableau 3 : Spectre d'activité des  $\beta$ -lactamases de classe A [d'après Bonnet R., AntibioGramme, 3<sup>ème</sup> Edition, Chapitre 16, p.168]

- ***Pénicillinasés et enzymes dérivées conférant une résistance aux IBL***

Certaines entérobactéries (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *C. amalonaticus* et *E. hermanni*) produisent naturellement des « pénicillinasés bas niveau » et sont de ce fait résistantes aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et, à moindre degré, aux uréidopénicillines. Des pénicillinasés acquises peuvent être détectées parmi l'ensemble des entérobactéries. L'émergence de souches d'entérobactéries productrices de pénicillinasés plasmidiques à large spectre de type TEM (TEM-1 et TEM-2) ou SHV (SHV-1) a eu lieu au cours des années 60-70. Cette résistance (plus souvent due à TEM-1) est à l'heure actuelle plus fréquente chez *E. coli* et *P. mirabilis* (40 à 55% des souches) que chez les autres espèces d'entérobactéries. L'expression des pénicillinasés acquises peut être faible (résistance surtout marquée pour les aminopénicillines et carboxypénicillines) ou forte (résistance affectant l'ensemble des pénicillines, les C1G et parfois les C2G ; activité variable des pénicillines associées aux IBL) selon la nature du promoteur du gène de structure, du nombre de copies du gène et de l'espèce.

L'émergence de souches produisant des pénicillinasés conférant une résistance marquée aux pénicillines associées aux IBL et dérivées par mutation ponctuelle, le plus souvent de TEM-1, TEM-2 voire plus rarement de SHV-1, a été observée. Lorsque ces enzymes sont dérivées de pénicillinasés de type TEM, elles sont dénommées TRI (TEM résistantes aux

IBL). Ces souches sont résistantes aux pénicillines et aux associations pénicillines/IBL, mais sensibles aux C1G [Bonnet 2011].

- **BLSE**

Les BLSE sont des enzymes qui hydrolysent aussi bien les pénicillines que les oxyiminocéphalosporines (ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime...) et les monobactames (aztréonam). Les céphamycines (céfoxitine, céfotétan, latamoxef) et les carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème et doripénème) restent actifs, alors que les activités des C4G (céfépime, cefpirome) et celles des associations  $\beta$ -lactamines/IBL (amoxicilline ou ticarcilline associé à l'acide clavulanique, ou encore pipéracilline associé au tazobactam) sont variables.

Certaines entérobactéries (*Kluyvera* spp., *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter sedlakii*, *Erwinia persicina*) produisent naturellement des BLSE de classe A, souvent exprimées à bas niveau. Des BLSE acquises ont par ailleurs émergé durant les années 80-90, période d'avènement des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et de l'aztréonam [Arlet *et al.* 2003]. A cette époque, les souches ayant acquis une BLSE de classe A appartenaient de manière prédominante à l'espèce *K. pneumoniae* et au genre *Enterobacter*. Elles étaient essentiellement responsables d'infections nosocomiales et étaient parfois responsables d'épidémies intra-hospitalières. Ces BLSE dérivait des pénicillinases à large spectre de type TEM ou SHV. Leur support génétique était en général plasmidique [Philippon *et al.* 2005]. La première BLSE de classe A décrite en Allemagne en 1983 chez *K. pneumoniae* et *Serratia marcescens*, dérivait d'une pénicillinase de type SHV-1 et a été nommée par analogie SHV-2. En 1984, une souche de *K. pneumoniae* productrice d'une BLSE (nommée TEM-3) dérivée d'une pénicillinase de type TEM, a été caractérisée en France. Dans les deux cas le déterminant génétique était plasmidique et transférable par conjugaison. Les espèces *K. pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* ont été plus fréquemment impliquées dans des épidémies de BLSE de type TEM et SHV, les autres espèces beaucoup moins. Selon la nature des mutations, ces enzymes confèrent une résistance plus marquée à la ceftazidime qu'au céfotaxime (ex : TEM-5, TEM-24, SHV-4, SHV-5) ou équivalente pour ces deux molécules (ex : TEM-3, SHV-2) [Bonnet 2011, Philippon *et al.* 2005].

Au début des années 2000, de nouvelles BLSE, non dérivées des pénicillinases TEM et SHV, ont émergé. Il s'agissait de céfotaximases (CTX-M) ou de ceftazidimases (PER, GES, VEB ...). Il est à souligner que les CTX-M sont devenues les BLSE les plus fréquemment détectées dans le monde entier. Ces enzymes, du moins pour les premiers variants, hydrolysent plus efficacement le céfotaxime que la ceftazidime d'où leur nom de CTX-M. L'émergence de ces souches résulte au départ d'une mobilisation vers d'autres entérobactéries, surtout *E. coli*, de gènes codant ces enzymes et présents à l'état naturel chez des bactéries environnementales. A ce jour, plus de 84 variants CTX-M, regroupés en 5 groupes principaux (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25), ont été identifiés (voire même 6 groupes avec « Kluc-1 group ») [Bonnet 2004, HCSP 2010]. Cette émergence a été observée en milieu hospitalier ainsi qu'en milieu communautaire [Canton *et al.* 2012]. A l'heure actuelle, la majorité des entérobactéries produisant une BLSE et responsables d'infections humaines – d'origine endogène ou exogène - produisent une BLSE de type CTX-M. Parmi ces isolats, on note une prédominance de souches appartenant à l'espèce *E. coli*, mais la production de CTX-M peut être observée chez de nombreuses espèces d'entérobactéries incluant notamment l'espèce *K. pneumoniae* [Bonnet 2011].

L'épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) a beaucoup évolué car d'importants changements ont eu lieu ces 10 dernières années. L'incidence des EBLSE a augmenté dans le monde entier avec notamment l'explosion mondiale des BLSE de type CTX-M, décrites ci-dessus, qui ont supplanté les BLSE de type TEM/SHV dans la plupart des pays (excepté les Etats-Unis). En Europe, la prévalence de ces souches est variable en fonction des pays. En France, l'incidence des EBLSE a été multipliée par 8 entre 2002 et 2008 [InVS 2010]. Le changement de bactérie hôte a vu les BLSE émerger des espèces nosocomiales épidémiques classiques *K. pneumoniae/Enterobacter* spp. vers *E. coli*. De plus, une augmentation très nette des infections communautaires (notamment urinaires) dues à des bactéries productrices de BLSE a été observée. A côté des CTX-M, les BLSE dites « mineures » restent plus rares même si certaines ont été décrites dans différentes parties du monde (GES, PER, VEB). Certaines de ces BLSE « mineures » ont pu élargir, par mutation, leur spectre d'hydrolyse aux carbapénèmes (Ex : GES-2) pouvant être alors à l'origine de l'émergence de micro-organismes « pan-résistants » [Nordmann *et al.* 2009]. Cette émergence de plus en plus fréquente de souches multirésistantes vient également de la possibilité d'association des BLSE à différentes  $\beta$ -lactamases (BLSE associée à une AmpC plasmidique,

BLSE associée à une carbapénémase, voire BLSE associée à une AmpC plasmidique et à une carbapénémase) ; cela limite d'autant plus les options de traitement et mène à des impasses thérapeutiques parfois gravissimes [Cattoir 2008, Dubouix *et al.* 2004, HCSP 2011].

- **Carbapénémases** (voir aussi II.3)

Des souches d'entérobactéries appartenant notamment aux genres *Enterobacter* et *Serratia* produisent des carbapénémases de classe A chromosomiques inductibles (NMC-A, SME, SFC-1), responsables d'une sensibilité diminuée ou d'une résistance aux pénicillines, aux C1G, aux C3G et à l'imipénème. Ces souches sont cependant rares et restent sensibles aux C4G. L'émergence de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases de classe A plasmidiques de type GES, IMI, et surtout à l'heure actuelle KPC, est plus préoccupante en raison du potentiel de diffusion de cette résistance [Queenan *et al.* 2007]. Ces carbapénémases peuvent conférer une résistance à presque toutes les  $\beta$ -lactamines, y compris les C3G, les C4G et les carbapénèmes et sont inhibées de manière variable par les IBL [Bonnet 2011, Nordmann *et al.* 2012].

#### II.2.2.2.2. Enzymes de classe B (voir aussi II.3)

Les enzymes de classe B sont des carbapénémases aussi appelées métallo- $\beta$ -lactamases (=MBL) en raison de leur cofacteur : l'ion  $Zn^{2+}$ . Elles hydrolysent plus ou moins toutes les  $\beta$ -lactamines y compris les carbapénèmes (résistance à l'imipénème de plus ou moins haut niveau d'où une détection parfois malaisée), à l'exception de l'aztréonam [Arlet *et al.* 2005]. Elles ne sont pas inhibées par les IBL comme l'acide clavulanique, mais inhibées par les chélateurs d'ions comme l'EDTA [Bonnet 2011]. Parmi elles, on peut citer les carbapénémases codées par les gènes plasmidiques *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> et *bla*<sub>NDM-1</sub>.

### II.2.2.2.3. Enzymes de classe C

Les enzymes de la classe C sont des céphalosporinases (AmpC). Ces enzymes sont produites naturellement à bas niveau par les *E. coli* et les *Shigella* spp. Dans ce cas, il s'agit d'une céphalosporinase chromosomique non inductible qui peut conférer une sensibilité réduite aux aminopénicillines, associées ou non à l'acide clavulanique, et/ou aux C1G. D'autres entérobactéries produisent aussi naturellement une céphalosporinase qui est cependant inductible par les  $\beta$ -lactamines. Il s'agit tout d'abord de *P. vulgaris* et *P. penneri* qui produisent une céfuroximase conférant une résistance aux aminopénicillines, aux C1G et aux C2G (incluant le céfuroxime), en dehors des céphamycines, et une sensibilité aux associations pénicillines/IBL. De nombreuses autres espèces (groupe 3 des entérobactéries selon la classification prenant en compte la présence naturelle de  $\beta$ -lactamases chez les entérobactéries), incluant *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* et *Pantoea agglomerans*, produisent également une céphalosporinase chromosomique inductible dont le spectre d'hydrolyse comprend, en plus des aminopénicillines et des C1G, les associations aminopénicillines/acide clavulanique et parfois, de manière variable selon les espèces et les isolats, les C2G, autres que les céphamycines, et/ou les céphamycines. Enfin, il est à noter que certaines entérobactéries (*Yersinia enterocolitica*, *S. fonticola*), produisant naturellement une céphalosporinase inductible de classe C, produisent aussi naturellement une autre enzyme de classe A (Ex : pénicillinase constitutive de classe A produite à bas niveau chez *Y. enterocolitica*) [Bonnet 2011].

Chez certaines souches appartenant au groupe 3 des entérobactéries, une hyperproduction constitutive d'AmpC peut être observée. Ce phénomène qui est la conséquence de mutations affectant des gènes de régulation d'AmpC, contribue à rendre ces souches résistantes à l'aztréonam, aux céphamycines (sauf *H. alvei*) et aux C3G. Les C4G restent en général actives. Ce phénotype, appelé « céphalosporinase de haut niveau », se caractérise également par le fait que la résistance aux C3G peut être inhibée par la cloxacilline, mais pas par les IBL. Ce phénotype peut également être observé chez *E. coli* et résulte alors de mutations du promoteur ou d'un gène atténuateur et/ou de duplications du gène de structure. Le phénotype « céphalosporinase de haut niveau » peut aussi avoir un support plasmidique. Il s'agit alors de plasmides souvent conjugatifs qui possèdent des gènes



AmpC (CMY, FOX, MOX ...) qui diffusent au sein de nombreuses espèces d'entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp., *P. mirabilis*...) [Bonnet 2011].

#### II.2.2.1.4. Enzymes de classe D

Les enzymes de la classe D sont des « sérine protéases » appelées « oxacillines » (= OXA- $\beta$ -lactamases) qui constituent un groupe très hétérogène. La plupart hydrolysent très fortement les pénicillines M (oxacilline (d'où leur nom), cloxacilline, méticilline), mais on observe tout de même une résistance très variable aux céphalosporines, aux carbapénèmes et selon les enzymes une certaine sensibilité aux C3G et C4G. Ces enzymes très variables, de par leur support génétique (le plus souvent plasmidique) et leurs propriétés chimiques, sont caractérisées classiquement par un phénotype « pénicillinase peu sensible aux IBL » (néanmoins OXA-18 par exemple est très sensible à l'acide clavulanique [Philippon *et al.* 1997]) et ayant une légère activité vis-à-vis des céphalosporines à spectre étroit. Elles sont inhibées de manière variable par le NaCl [Queenan *et al.* 2007]. Les gènes codant ces enzymes se trouvent le plus fréquemment dans des intégrons de classe 1, mais il a été montré que des structures incluant des séquences d'insertion et des transposons pouvaient être également le support génétique de certains gènes codant ces enzymes (Ex : gène *bla*<sub>OXA-48</sub>) [Poirel *et al.* 2010, Walther-Rasmussen *et al.* 2006]. Ces gènes, identifiés au début comme une source de résistance acquise chez les bactéries Gram négatif, sont aussi naturellement présents chez des pathogènes cliniquement significatifs (entérobactéries et *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) et dans des espèces environnementales [Queenan *et al.* 2007]. Cette classe D comprend quatre catégories d'enzymes différentes si on considère le spectre d'hydrolyse : des enzymes naturellement présentes dans l'environnement, des enzymes acquises au spectre d'hydrolyse étroit («  $\beta$ -lactamases acquises de classe D à spectre étroit ») ou plus large (« oxacillines acquises à spectre étendu »), mais également 9 sous-groupes d'OXA-carbapénémases («  $\beta$ -lactamases acquises de classe D hydrolysant les carbapénèmes » = CHDLs = « Carbapenems Hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases ») basés sur l'homologie des acides aminés [Poirel *et al.* 2010]. Globalement, dans cette dernière catégorie de carbapénémase de classe D, nommée « CHDLs », l'activité d'hydrolyse des carbapénèmes est faible et ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique et l'EDTA, mais par le

NaCl à un degré variable. Les « CHDLs » sont pour la plupart isolées chez *A. baumannii*, mais le haut niveau de résistance à l'imipénème observé chez cette espèce n'est pas retrouvé quand les gènes codant la carbapénémase sont clonés chez *E. coli*, ou quand le même type d'enzyme est rapporté chez *P. mirabilis*, ce qui laisse supposer qu'un autre mécanisme de résistance, comme l'imperméabilité ou l'efflux, s'ajoute à celui de l'activité enzymatique [Philippon *et al.* 2006]. Bien que la plupart des « CHDLs » aient été décrites presque uniquement chez *A. baumannii*, certaines sont maintenant isolées d'entérobactéries, notamment OXA-48 [Queenan *et al.* 2007].

Au sein des entérobactéries, divers profils de résistance phénotypique peuvent être observés. Certaines souches produisent des oxacillinases qui ont un spectre d'hydrolyse proche de celui observé avec les TRI, avec une activité hydrolytique conférant une diminution souvent difficile à détecter de la sensibilité aux C4G. Certaines entérobactéries produisent des oxacillinases à spectre étendu (conférant une résistance aux C3G et aux C4G) ou des oxacillinases possédant une activité carbapénémase [Poirel *et al.* 2010]. Concernant les principales oxacillinases isolées chez les entérobactéries, OXA-48 et OXA-181, ont un profil d'hydrolyse particulier similaire : elles épargnent la ceftazidime, hydrolysent très faiblement le céfotaxime et sont résistantes à l'action des IBL [Poirel *et al.* 2004]. Elles sont rarement responsables à elles seules du phénotype de résistance aux  $\beta$ -lactamines des entérobactéries chez lesquelles elles sont isolées, car elles sont la plupart du temps associées à d'autres  $\beta$ -lactamases, notamment des BLSE [Carrër *et al.* 2008, Carrër *et al.* 2010, Cuzon *et al.* 2011, Matar *et al.* 2010, Nordmann *et al.* 2012, Poirel *et al.* 2010, Poirel *et al.* 2012].

## II.3. Les carbapénémases chez les entérobactéries

### II.3.1. Carbapénémases et résistance aux carbapénèmes (et autres $\beta$ -lactamines)

Comme nous l'avons vu précédemment les carbapénémases produites par les entérobactéries peuvent appartenir à trois des quatre classes d'Ambler [Queenan *et al.* 2007] (Tableau 4).

Classification d'Ambler	Type d'enzyme	Espèce(s)
A (type sérine)	KPC	entérobactéries, <i>P. aeruginosa</i>
	SME	<i>S. marcescens</i>
	NMC-A, IMI	<i>Enterobacter</i> spp.
B (métallo- $\beta$ -lactamases)	GES	<i>P. aeruginosa</i> , entérobactéries
	IMP, VIM, NDM	entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Acinetobacter</i> spp
D (type sérine)	OXA	<i>Acinetobacter</i> spp, (entérobactéries)

Tableau 4 : Principales carbapénémases produites par des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif [Queenan *et al.* 2007]

Ces enzymes, qui inactivent un grand nombre de  $\beta$ -lactamines, et notamment les carbapénèmes, ont cependant un spectre d'hydrolyse variable selon le type d'enzyme [Nordmann *et al.* 2012, Queenan *et al.* 2007] (Tableau 5).

Classe d'Ambler	Enzymes	Support génétique	Spectre d'hydrolyse						Inhibiteur(s)
			pénicillines	C1G	C2G	C3G	ATM	carbapénèmes	
A	SME-1 à -13	chromosome	++	++	-	+	+	+	acide clavulanique, tazobactam, sulbactam
	NMC-A	chromosome	++	++	-	+	-	++	
	IMI-2	plasmide	++	++	-	+	-	++	
	GES-4, -5, -6	plasmide	++	++	+	+	-	+	
	KPC-2 à -12	plasmide	++	++	-	++	+	++	acide clavulanique, tazobactam, sulbactam, acide boronique
B	IMP-1 à -33	plasmide	++	++	++	++	-	++	EDTA
	VIM-1 à -33	plasmide	++	++	++	++	-	++	
	NDM-1 à -6	plasmide	++	++	++	++	-	+	
D	OXA-48	plasmide	++	++	+/-	+/-	-	+	NaCl
	OXA-181	plasmide	++	++	+/-	+/-	-	+	

Tableau 5 : Principales carbapénémases chez les entérobactéries : support génétique, spectre d'hydrolyse et molécules actives [Nordmann *et al.* 2012]

La résistance aux carbapénèmes est également variable selon la nature des carbapénémases et des isolats [Nordmann *et al.* 2012] (Tableau 6).

Carbapénémase	CMI (mg/L)		
	imipénème	méropénème	ertapénème
KPC	0,5 à > 64	1 à 64	0,5 à > 64
MBL (incluant NDM-1)	0,5 à > 64	0,25 à > 64	0,5 à > 64
OXA-48	1 à > 64	0,5 à > 64	0,25 à > 64

Tableau 6 : Variabilité des CMI de trois carbapénèmes chez des entérobactéries produisant différents types de carbapénémases [Nordmann *et al.* 2012]

De plus, l'association à d'autres résistances se retrouve fréquemment pour les oxacillines et quand les gènes codant ces enzymes sont associés à d'autres gènes codant des BLSE par exemple, cela augmente le spectre d'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines [Carrër *et al.* 2010, Cuzon *et al.* 2008]. En effet, la BLSE confère une résistance aux  $\beta$ -lactamines non visées par la carbapénémase elle-même et la souche peut alors être résistante à toutes les  $\beta$ -lactamines. Le tableau ci-après (Tableau 7) nous montre des exemples de phénotypes de résistance chez des souches d'entérobactéries produisant soit une carbapénémase seule, soit une carbapénémase associée à une BLSE [Nordmann *et al.* 2012].

Carbapénémase $\pm$ BLSE	$\beta$ -lactamines								
	AMX	AMC	TZP	CTX	CAZ	IMP	MER	ERT	ATM
KPC	R	S/I	R	R	R	S/I/R	S/I/R	I/R	R
KPC + BLSE	R	I/R	R	R	R	I/R	I/R	I/R	R
IMP ou VIM ou NDM	R	R	I/R	R	I/R	S/I/R	S/I/R	I/R	S
IMP ou VIM ou NDM + BLSE	R	R	I/R	R	R	I/R	S/I/R	R	R
OXA-48 ou OXA-181	R	R	S/I/R	S/I	S	S/I	S/I	S/I	S
OXA-48 ou OXA-181 + BLSE	R	R	I/R	R	R	I/R	I/R	I/R	R

Tableau 7 : Phénotypes de résistance résultant de la production de carbapénémases chez des souches d'entérobactéries produisant ou non une BLSE associée [Nordmann *et al.* 2012]

### **II.3.2. Carbapénémases : aspects épidémiologiques**

Les  $\beta$ -lactamases ayant une activité de carbapénémase sont les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. La plupart ont un support plasmidique et les gènes codant ces enzymes sont associés à des éléments génétiques mobiles (séquences d'insertion, intégrons, transposons) facilitant alors leur dissémination [Aubert *et al.* 2006, Nordmann *et al.* 2012]. Cette dernière peut être due, d'une part, à la diffusion clonale des souches d'entérobactéries produisant ces carbapénémases [Condon *et al.* 2011, Dimou *et al.* 2012, Dortet *et al.* 2012, Heller *et al.* 2011, Poirel *et al.* 2011], et d'autre part, à l'environnement génétique du gène codant ces enzymes [Benouda *et al.* 2010]. Ces carbapénémases sont identifiées de façon croissante chez les entérobactéries dans le monde entier, à la fois dans les hôpitaux et dans le milieu communautaire [Nordmann *et al.* 2010, Poirel *et al.* 2012].

Parmi les carbapénémases de classe A, seules celles de type KPC ont été très largement rapportées dans le monde. Les autres carbapénémases de classe A ont été identifiées ponctuellement, bien que *E. asburiae*, exprimant la  $\beta$ -lactamase IMI-1, ait été identifiée dans de nombreuses rivières américaines [Nordmann *et al.* 2010]. Les carbapénémases KPC (essentiellement KPC-2) ont été identifiées essentiellement chez *K. pneumoniae* et plus rarement chez *E. coli*, *P. mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. [Cuzon *et al.* 2011]. Après leur identification sur la côte Est des Etats-Unis, en Caroline du Nord en 1996, d'autres souches d'entérobactéries productrices d'enzymes de type KPC ont été très rapportées dans la plupart des états des Etats-Unis, avec une forte prévalence dans l'état de New-York [Nordmann *et al.* 2009]. Puis, ces souches ont été très décrites en Israël et en Grèce où elles semblent être maintenant endémiques (Figure 6). Elles ont été rapportées également dans la plupart des pays européens de façon sporadique, au Canada, en Amérique du Sud, dans les Caraïbes et en Chine [Cuzon *et al.* 2010]. En France, des souches d'entérobactéries productrices de KPC ont été identifiées [InVS 2012]. Dans tous les cas généralement, il s'agit de souches de *K. pneumoniae* exprimant KPC-2 provenant de patients hospitalisés auparavant en Grèce, en Israël et aux Etats-Unis [Nordmann *et al.* 2009].

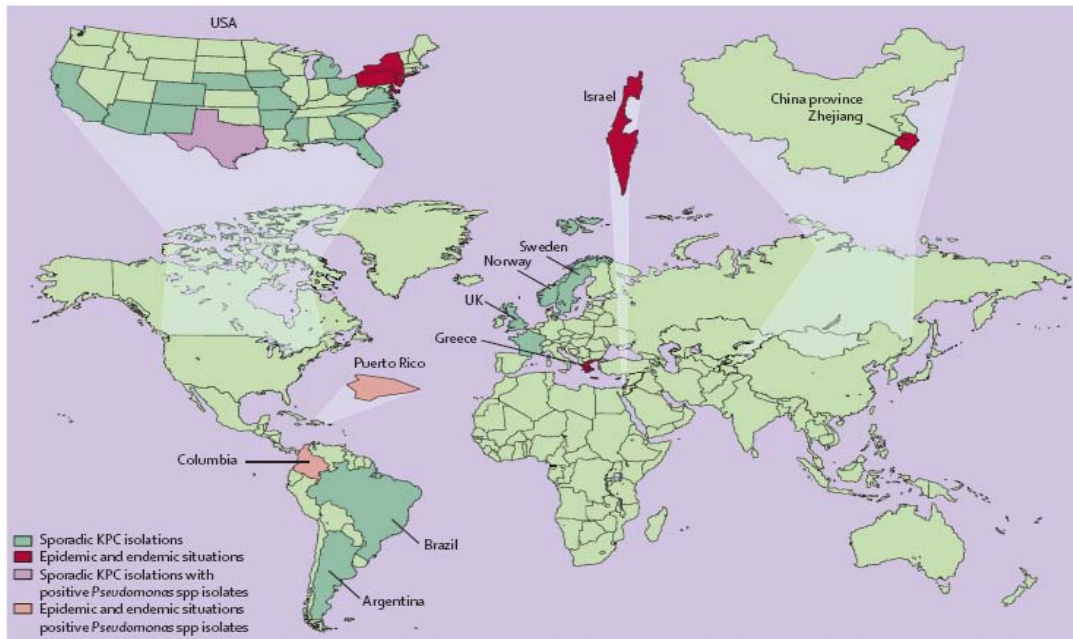


Figure 6 : Distribution mondiale des souches productrices de KPC [Nordmann *et al.* 2009]

Les carbapénémases de classe B (VIM, IMP...) ont été également décrites dans le monde entier avec une forte prévalence en Europe du Sud et en Asie. Leur hôte le plus habituel est *K. pneumoniae* avec des niveaux d'expression de la résistance aux carbapénèmes variables. Initialement retrouvées dans une souche d'*E. coli* en Grèce (VIM-1), ces métallo-enzymes sont apparues rapidement dans des isolats de *K. pneumoniae* et d'autres entérobactéries et sont devenues endémiques en Grèce et dans d'autres pays d'Europe [Heller *et al.* 2011]. Plusieurs épidémies de souches d'entérobactéries produisant ces carbapénémases ont été identifiées, notamment au Japon, en Italie, en Espagne et en Grèce. L'Europe du Sud contribue fortement à la diffusion de ces marqueurs de résistance (VIM-1 notamment) [Nordmann *et al.* 2010]. En France, quelques cas d'épidémies nosocomiales ont été également décrites (VIM-2 à Marseille, Paris, Nantes et IMP-1 à Amiens notamment) [InVS 2010, 2012]. NDM-1 est l'une des métallo- $\beta$ -lactamases les plus récemment isolées. Elle a eu, très vite après sa découverte chez un patient d'origine suédoise hospitalisé à New-Delhi en 2008 [Hsueh *et al.* 2010], une diffusion internationale importante (Figure 7), identifiée dès 2010 au moins en Inde, au Pakistan et en Grande-Bretagne chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en milieu hospitalier et également en milieu communautaire [Nordmann *et al.* 2010].

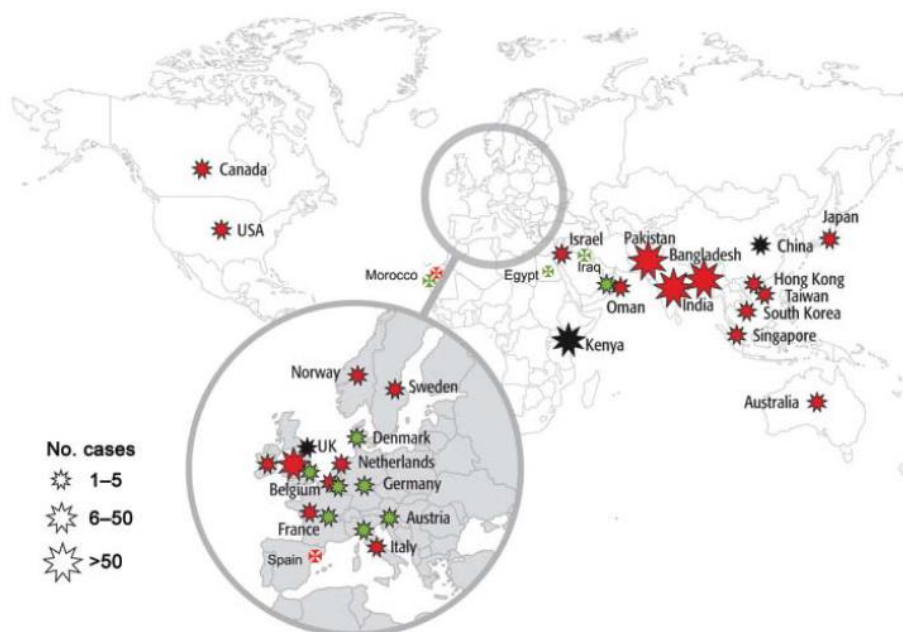


Figure 7 : Distribution mondiale des souches productrices de NDM-1 au 15/07/2011 [Nordmann *et al.* 2011]

Enfin, OXA-48 (voir paragraphe suivant II.3.3), carbapénémase appartenant à la classe D, est l'une des carbapénémases les plus récemment décrites. Elle a émergé en Turquie à partir d'une souche de *K. pneumoniae* (KP 11978) et a diffusé dans d'autres pays du pourtour méditerranéen [Canton *et al.* 2012, Carrër *et al.* 2008].

Il a quand même été suggéré récemment que la dissémination des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) était dominée en milieu hospitalier par des souches de *K. pneumoniae* pouvant produire tous les types de carbapénémases (principalement KPC, VIM, NDM et OXA-48) et en milieu communautaire par des souches d'*E. coli* produisant les enzymes NDM ou celles de classe D (OXA-48 et OXA-181) [Canton *et al.* 2012, Dimou *et al.* 2012, Nordmann *et al.* 2011].

En France, la première description d'une EPC a été faite en 1993 chez une souche d'*E. cloacae* qui produisait une enzyme de type NMC-A. Ensuite, un isolat de *K. pneumoniae* produisant la carbapénémase VIM-1, associée à la BLSE SHV-5, a été rapporté en 2004 puis se sont succédé des épidémies nosocomiales. VIM-19 a été par la suite isolée chez des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. coli* d'un patient transféré d'Algérie. En avril 2009 a eu lieu



la première identification de NDM-1 en France, puis en 2011 dans le sud de la France la première NDM-1 acquise en milieu communautaire suivie par d'autres cas autochtones dans des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*. C'est en février 2005 que fut décrite la première KPC française chez un patient venant de New-York. Depuis, de nombreux cas nosocomiaux ont été rapportés venant de toutes zones d'endémie (Israël, Grèce, USA, Italie) [Nordmann *et al.* 2011]. La première OXA-48 a été isolée en France en 2009 à Paris chez un patient venant de Tunisie [Canton *et al.* 2012, Cuzon *et al.* 2011].

Dans le bilan au 18 mai 2012 de l'InVS, le nombre d'épisodes impliquant des EPC en France était de 211 depuis 2004. Sur les 211 épisodes au total, 10 ont eu lieu en 2009, 28 en 2010, 111 en 2011, et 53 en 2012. Ces épisodes représentaient 433 cas, avec 1 à 47 cas par épisode (www.invs.sante.fr).

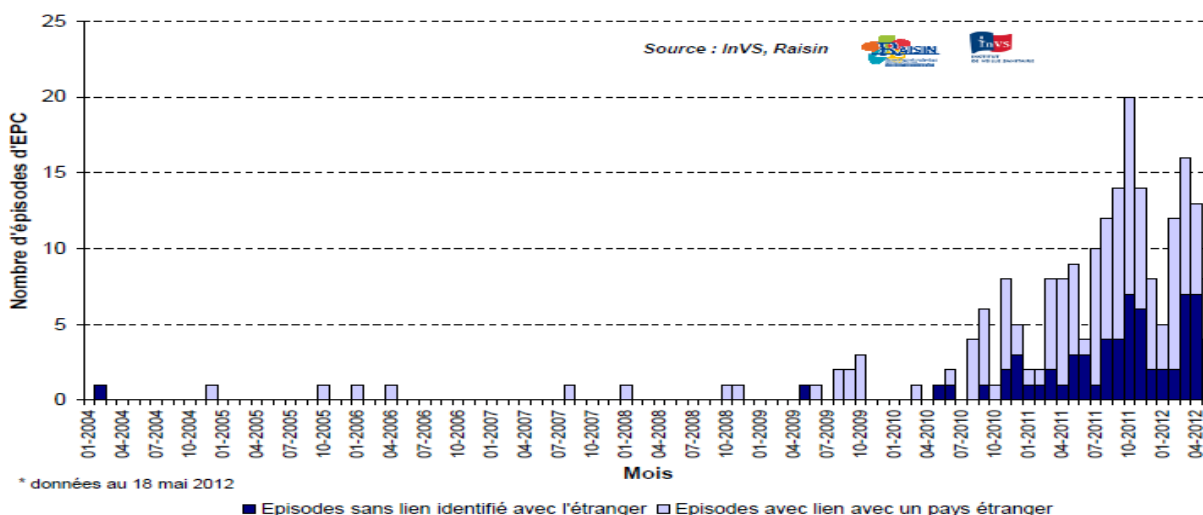


Figure 8 : Nombre d'épisodes impliquant des EPC par mois de signalement

Les épisodes signalés correspondent en majorité à des cas importés de l'étranger (Figure 8), dans un contexte de transfert direct d'hôpital à hôpital, suite à un rapatriement sanitaire, ou d'antécédent d'hospitalisation à l'étranger [Decre *et al.* 2010, Dimou *et al.* 2012]. Le nombre d'épisodes associés à des séjours ou le fait de résider à l'étranger sans hospitalisation est plus faible. Les pays les plus fréquemment rapportés sont le Maroc, la Grèce puis l'Inde [InVS 2012, Poirel *et al.* 2011]. La proportion d'épisodes sans lien retrouvé avec un pays étranger augmente régulièrement (notamment OXA-48 avec 10% des épisodes depuis le début de l'année 2012 considérés comme communautaires). Cette évolution suggère une diffusion progressive et autochtone des EPC, notamment de type OXA-48, qui peut être favorisée par une reconnaissance parfois difficile de ces souches. Les établissements de santé

et les laboratoires de biologie médicale doivent donc rester vigilants devant tout isolement au laboratoire d'une entérobactérie de sensibilité diminuée à un des carbapénèmes, même en l'absence de notion de rapatriement ou de séjour à l'étranger.

### II.3.3. Oxacillinase-48 (OXA-48)

Le réservoir naturel du gène de résistance *bla*<sub>OXA-48</sub>, codant la carbapénémase OXA-48, a été déterminé comme étant *Shewanella oneidensis* (la même séquence ayant été identifiée sur le chromosome de cette espèce) [Poirel *et al.* 2004]. Cela suggère un transfert environnemental de ce gène en milieu aqueux puisque cette espèce d'origine hydrique n'est pas un pathogène humain. On retrouve OXA-48 dans la 6<sup>ème</sup> branche des précurseurs des carbapénémases de type oxacillinase (Figure 9) avec notamment OXA-54 pour laquelle l'espèce *Shewanella oneidensis* a aussi été retrouvée comme possédant naturellement le gène *bla*<sub>OXA-54</sub> [Walther-Rasmussen *et al.* 2006].

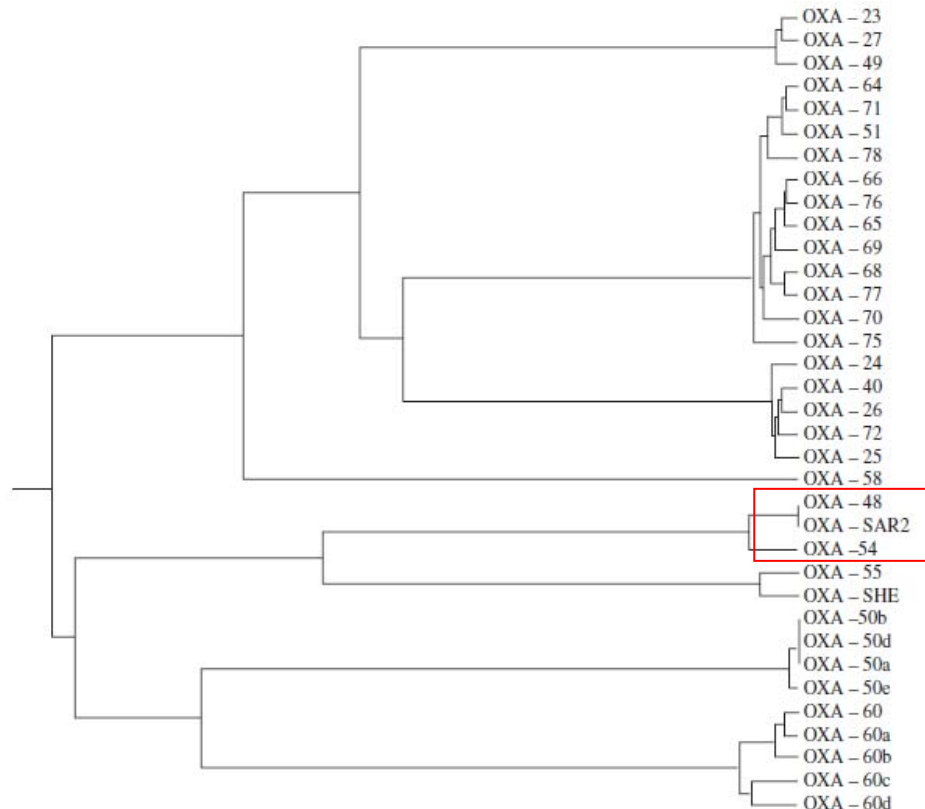


Figure 9 : Diagramme des précurseurs des carbapénémases de type oxacillinase [Walther-Rasmussen *et al.* 2006]

*Shewanella* spp. constitue en général le réservoir des « CHDLs » et la présence, à la fois de *Shewanella* spp. et d'entérobactéries dans le même environnement aqueux, pourrait expliquer la diffusion de ces gènes codant les « CHDLs » de l'environnement jusqu'à l'Homme [Poirel *et al.* 2004, Poirel *et al.* 2012, Nordmann *et al.* 2012]. En effet, cette résistance naturellement présente dans l'environnement pourrait diffuser jusqu'aux différentes espèces bactériennes permettant alors l'acquisition de ce caractère de résistance, et cela par l'intermédiaire de différents clones [Potron *et al.* 2011, Poirel *et al.* 2012, Dimou *et al.* 2012]. Notons que *Shewanella xiamenensis* est le réservoir naturel du gène codant l'OXA-181 (variant, au profil d'hydrolyse similaire, d'OXA-48) [Walther-Rasmussen *et al.* 2006].

La diffusion initiale du gène *bla*<sub>OXA-48</sub> est due à son environnement génétique ; en effet, ce gène plasmidique (plasmide conjugatif de 62 kb pour la souche KP11978) a la particularité d'être associé à la séquence d'insertion *IS1999* qui lui assure mobilité et expression [Aubert *et al.* 2006, Carrère *et al.* 2008, Carrère *et al.* 2010, Cuzon *et al.* 2011, Dimou *et al.* 2012, Poirel *et al.* 2011, Potron *et al.* 2011]. Ce type de support génétique diffère de la plupart des gènes codant les  $\beta$ -lactamases de classe D qui sont souvent identifiés comme étant sous forme de cassettes de gènes localisées sur des structures de type intégron de classe 1 [Walther-Rasmussen *et al.* 2006]. Des études par PCR avec des amorces spécifiques de cette séquence d'insertion *IS1999* et de la partie 5' du gène *bla*<sub>OXA-48</sub> ont montré que ce gène était inclus dans un transposon composite *Tn1999* constitué de deux copies identiques de la séquence d'insertion spécifique *IS1999*, comme le montre la figure suivante [Aubert *et al.* 2006, Carrère *et al.* 2008, Poirel *et al.* 2011] (Figure 10).

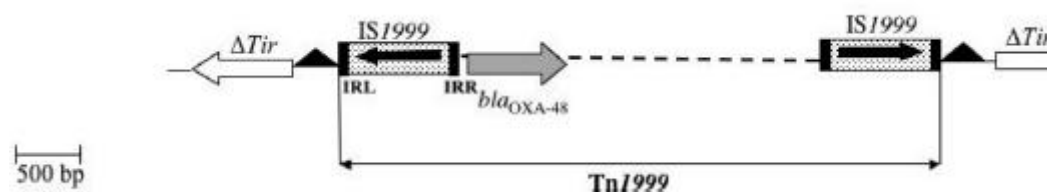


Figure 10 : Représentation schématique de l'environnement génétique du gène *bla*<sub>OXA-48</sub> [Poirel *et al.* 2011]

L'enzyme OXA-48 hydrolyse plus ou moins les carbapénèmes, mais presque pas les C3G [Poirel *et al.* 2004] ; en effet, elle hydrolyse très mal le céfotaxime et pas significativement la ceftazidime et le céfépime [Docquier *et al.* 2009]. Elle n'est pas inhibée

par les IBL (comme l'acide clavulanique) et par les chélateurs d'ions (comme l'EDTA). Par contre, *in vitro*, elle peut être inhibée par le NaCl [Poirel *et al.* 2010]. Cette enzyme est différente des autres oxacillinases de par sa structure (46% seulement d'homologie en acides aminés avec l'OXA-10, 36% avec l'OXA-23, 32% avec l'OXA-40 et 20% avec l'OXA-1) [Docquier *et al.* 2009] et son spectre : l'OXA-48 hydrolyse fortement les pénicillines et à moindre niveau les carbapénèmes [Poirel *et al.* 2011]. OXA-48 confère parfois une résistance aux carbapénèmes plus faible que les carbapénémases de classe A de type KPC [Nordmann *et al.* 2012]. A ce jour, plusieurs variants d'OXA-48 ont été rapportés : OXA-162, OXA-163 (mutant analogue qui a la propriété d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre et beaucoup moins les carbapénèmes [Poirel *et al.* 2011]), OXA-181, OXA-204 et OXA-232. A part OXA-163, ces variants ont des spectres presque identiques et c'est OXA-48 qui est l'enzyme la plus répandue [Poirel *et al.* 2012]. La résistance est variable selon les souches d'entérobactéries chez lesquelles ces enzymes sont retrouvées [Nordmann *et al.* 2012]. De plus, la multirésistance de ces souches est fréquente en raison de la présence d'autres mécanismes de résistance associés conférant alors une résistance plus forte aux carbapénèmes (association à une imperméabilité) [Gülmez *et al.* 2008, Matar *et al.* 2010, Poirel *et al.* 2012, Roche *et al.* 2011], ou à d'autres  $\beta$ -lactamines (association à une autre  $\beta$ -lactamase, par exemple une BLSE) [Cuzon *et al.* 2004, Cuzon *et al.* 2011] ou encore une possible résistance à d'autres antibiotiques que les  $\beta$ -lactamines (notamment aux quinolones, aux aminosides et plus ou moins souvent à la tigécycline ou à la colistine...) [Dortet *et al.* 2012, Nazic *et al.* 2005, Grall *et al.* 2011].

La première souche isolée produisant une OXA-48, KP 11978, présentait un haut niveau de résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines, y compris les céphalosporines à large spectre, les céphamycines, les monobactames et les carbapénèmes [Carrère *et al.* 2008]. Le plasmide de 62 kb, identifié comme étant le support du gène *bla*<sub>OXA-48</sub>, ne portait pas d'autres gènes de résistance [Carrère *et al.* 2008, Carrère *et al.* 2010]. Par contre, d'autres  $\beta$ -lactamases associées [TEM-1, SHV-2a, deux autres oxacillinases (OXA-47 et OXA-1)] et la modification de protéines de membrane externe conféraient à cet isolat clinique ce haut niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines [Carrère *et al.* 2008, Poirel *et al.* 2004]. L'association à d'autres  $\beta$ -lactamases (par exemple la CTX-M15 du groupe 1) a été retrouvée par la suite chez d'autres souches de *K. pneumoniae* produisant une OXA-48, comme nous le montre le tableau ci-après [Carrère *et al.* 2008, Carrère *et al.* 2010, Cuzon *et al.* 2011] (Tableau 8).

Souche	Pays d'origine	Autres $\beta$ -lactamases			
		SHV	TEM	CTX-M	OXA
VSG1-16	France	SHV-11	TEM-1	CTX-M15	OXA-1
UCL-1	Belgique	SHV-11	TEM-1		
KpE	Egypte	SHV-11	TEM-1	CTX-M15	OXA-1
HPA-1	Tunisie	SHV-11	TEM-1	CTX-M15	OXA-1
KpL	Liban	SHV-11	TEM-1	CTX-M15	OXA-1
11978	Turquie	SHV-2a	TEM-1		OXA-1 OXA-47

Tableau 8 : Autres  $\beta$ -lactamases associées dans différentes souches de *K. pneumoniae* produisant une OXA-48 d'origines géographiques diverses [d'après Cuzon *et al.* 2011]

La carbapénémase OXA-48 a été détectée initialement en Turquie en 2001 dans une souche de *K. pneumoniae* (KP 11978) [Aktas *et al.* 2008, Walther-Rasmussen *et al.* 2006]. Depuis, des souches productrices d'OXA-48 ont été retrouvées à de nombreuses reprises en Turquie, dans des isolats de *K. pneumoniae* et d'autres espèces d'entérobactéries, et ont été rapportées comme source d'infections nosocomiales dans ce pays [Carrër *et al.* 2008, Carrër *et al.* 2010]. Leur distribution dans le monde entier comprend maintenant des pays d'Europe [Cuzon *et al.* 2008, Potron *et al.* 2011] (y compris la France [Cuzon *et al.* 2011, Decre *et al.* 2010, Levast *et al.* 2011]), des pays du pourtour méditerranéen [Potron *et al.* 2011] et d'Afrique (Liban, Tunisie, Israël, Egypte) [Matar *et al.* 2010, Lahlaoui *et al.* 2012, Mocquet *et al.* 2011]. Des souches ont aussi été détectées en Grande-Bretagne [Dimou *et al.* 2012, Livermore *et al.* 2009] et en Argentine [Castanheira *et al.* 2011]. Comme nous l'avons dit précédemment, la première OXA-48 isolée en France a été identifiée en 2009 à Paris dans une souche de *K. pneumoniae* d'un patient venant de Tunisie [Canton *et al.* 2012, Cuzon *et al.* 2011]. Depuis, des épidémies ont été décrites à différents endroits du globe, incluant notamment des pays d'Afrique du Nord [Benouda *et al.* 2010], du Moyen-Orient [Dortet *et al.* 2012], la Turquie et l'Inde, principaux réservoirs de ces enzymes [Poirel *et al.* 2011]. Aucune souche productrice d'OXA-48 n'a encore été signalée aux États-Unis et au Canada.

Le schéma ci-après (Figure 11) nous montre la répartition géographique des principales souches productrices de carbapénémases de type OXA-48 mises en évidence à ce jour. Notons que les souches isolées en Argentine, en Nouvelle Zélande et en Afrique du Sud n'apparaissent pas sur cette carte [Nordmann *et al.* 2011].

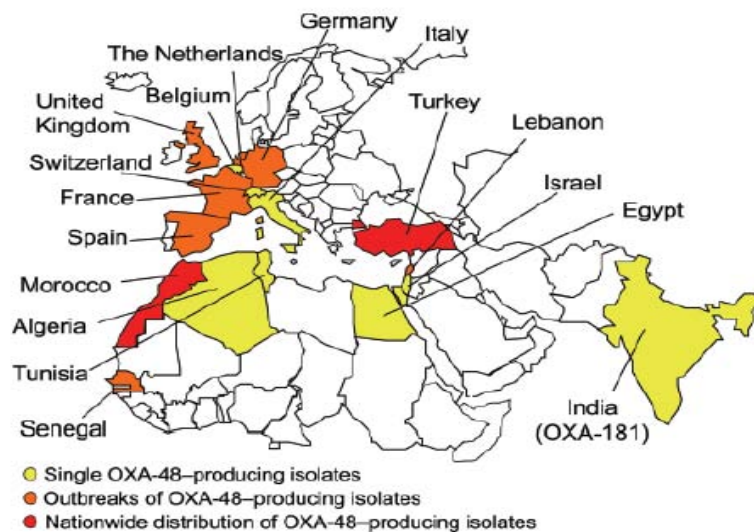


Figure 11 : Répartition géographique des souches productrices de  $\beta$ -lactamases de type OXA-48 [Nordmann *et al.* 2011]

Des cas sporadiques sont également de plus en plus fréquemment décrits et ces enzymes sont maintenant régulièrement isolées dans le milieu communautaire [Dimou *et al.* 2012]. Il y a une tendance à la hausse de la prévalence d'OXA-48 dans les pays comme la France, l'Allemagne, les Pays-Bas, l'Italie, la Belgique, le Royaume-Uni, l'Irlande, la Slovaquie, la Suisse et l'Espagne [Cuzon *et al.* 2008, InVS 2012, Kalpoe *et al.* 2011]. La carbapénémase la plus retrouvée actuellement en France est d'ailleurs l'OXA-48 [InVS 2012]. Le problème n'est plus seulement limité aux cas de transferts de patients hospitalisés dans des pays en situation endémique. En effet, un patient en France peut présenter une souche produisant une OXA-48 dont l'origine serait communautaire : un patient venant d'un pays de forte endémicité, mais non hospitalisé là-bas, peut rapporter une souche de colonisation et la disséminer en France. Parfois, aucun lien avec un séjour à l'étranger n'est retrouvé et des transmissions croisées entre patients doivent être redoutées [Denis *et al.* 2012, Vaux *et al.* 2011]. Des souches peuvent circuler dans les hôpitaux parfois sous forme d'épidémies et la menace d'une dissémination plus large et de caractère endémique est bien réelle [Cuzon *et al.* 2011].

Le risque de diffusion des souches produisant OXA-48 représente un problème majeur de santé publique, d'autant plus que leur prévalence est peut-être sous-estimée du fait de la difficulté de leur détection. En effet, cette dernière est particulièrement délicate si elle est basée sur le seul phénotype de résistance aux  $\beta$ -lactamines [Grall *et al.* 2011]. Comme nous

l'avons évoqué auparavant, en l'absence d'autres résistances associées, les souches ne produisant que l'OXA-48 peuvent ne présenter qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes [Cuzon *et al.* 2008, Dortet *et al.* 2012], parfois en dessous des limites de détection des méthodes utilisées au laboratoire en routine [Dimou *et al.* 2012, Grall *et al.* 2011].

### **II.3.4. Détection phénotypique des carbapénémases**

La détection des carbapénémases, bien qu'elle soit difficile à cause de l'expression variable de ces enzymes (parfois dans les limites de détection de nos méthodes) et de l'association à d'autres mécanismes de résistance aux carbapénèmes, est de plus en plus fréquente. Il est donc important de bien connaître les différentes méthodes à notre disposition pour les détecter dans un laboratoire en routine.

Il existe différents mécanismes de résistance pouvant toucher les carbapénèmes [Queenan *et al.* 2007]. Par exemple, l'hyperproduction de céphalosporinase AmpC associée à une imperméabilité membranaire par altération des porines est la cause la plus fréquente de résistance acquise aux carbapénèmes chez les entérobactéries [Bonnet 2011, Cuzon *et al.* 2011, Grall *et al.* 2011]. Une imperméabilité membranaire associée à la production d'autres  $\beta$ -lactamases, comme les BLSE de type CTX-M ou SHV par exemple, peut aussi conférer une résistance aux carbapénèmes chez certaines souches (*K. pneumoniae*, *E. coli*) [Bonnet 2011, Cuzon *et al.* 2011, Matar *et al.* 2010]. Il est à noter qu'une altération des porines seule peut également entraîner une diminution de sensibilité à l'imipénème par exemple chez *E. aerogenes* [Bonnet 2011]. Des études ont montré que pour l'ertapénème, une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines (OmpK35, OmpK36) pouvait aussi être responsable, en partie, de la diminution de sensibilité de certaines souches à ce carbapénème, par exemple chez des isolats de *K. pneumoniae* [Landman *et al.* 2009, Roche *et al.* 2011]. Néanmoins, en santé publique, le problème crucial en termes de résistance aux carbapénèmes concerne les carbapénémases qui peuvent diffuser facilement, entre autres, de par leur support génétique, et doivent être strictement contrôlées [Nordmann *et al.* 2012].

Des techniques phénotypiques et génotypiques sont utilisées pour identifier ces souches productrices de carbapénémases, mais avec une performance variable. Une approche moléculaire, en pratique courante, qui consisterait à la recherche systématique de tout gène est impossible ; ces techniques, basées par exemple sur la PCR avec des couples d'amorces spécifiques aux différents groupes de gènes de carbapénémases ou sur des techniques d'amplification/hybridation sur puces, sont onéreuses ; et même si elles peuvent permettre une identification rapide et précise des carbapénémases (détection de bas niveau de résistance, distinction des différents génotypes si elles sont suivies d'un séquençage, identification conjuguée des bactéries pour les techniques multiplex...), elles ne sont actuellement utilisées que dans des laboratoires spécialisés. De plus, elles ne s'appliquent qu'à des gènes déjà connus (à part pour le séquençage) alors que l'émergence de nouvelles enzymes est réelle. Elles ne détectent pas les carbapénémases s'il y a des substitutions sur les gènes de résistance recherchés ; et pour les techniques sur puces (Ex : kit Check MDR<sup>®</sup> [Naas *et al.* 2011]), elles ne détectent que les enzymes recherchées par le kit correspondant. Cela impose bien un tri préalable des souches par une détection phénotypique afin de repérer les souches potentiellement productrices de carbapénémases avant leur étude approfondie en biologie moléculaire, technique de référence, qui plus est pour les carbapénémases de classe D.

Il existe deux approches principales dans la prévention et la dissémination de ces enzymes : la détection des souches responsables d'infections cliniques documentées et celle des souches colonisatrices qui ont été cultivées au préalable sur des milieux utilisés pour dépister les porteurs. En effet, la détection des souches de portage repose encore principalement sur l'utilisation de milieux de culture dits de « screening » [Nordmann *et al.* 2012, Poirel *et al.* 2012].

#### **II.3.4.1. Détection des souches productrices de carbapénémases parmi les isolats responsables d'infections**

La détection dans les souches infectantes repose en première intention sur une analyse minutieuse des résultats du phénotype de résistance déduit de l'antibiogramme obtenu par des



méthodes classiques. La détermination de la sensibilité aux antibiotiques se fait communément avec les systèmes automatisés, en milieu liquide, ou encore les méthodes de diffusion en gélose à l'aide de disques. A noter que les CMI des carbapénèmes réalisées par la technique de diffusion en gélose à l'aide des bandelettes E-test<sup>®</sup> sont parfois difficiles à interpréter du fait de la présence de microcolonies dans la zone elliptique d'inhibition (voir aussi IV.1.2) [Ruppé *et al.* 2011]. Les systèmes automatisés ne peuvent pas détecter de façon fiable tous les types de carbapénémases [Dimou *et al.* 2012], et en fonction des automates des discordances peuvent survenir ; de plus en milieu liquide, les CMI peuvent varier en fonction de l'inoculum [Miriagou *et al.* 2010]. Les carbapénémases n'entraînent pas toujours une augmentation suffisante des CMI pour une catégorisation « résistante » (« R ») des souches, voire même « intermédiaire » (« I »), et la capacité des automates à détecter ces enzymes a été peu ou pas évaluée. En conséquence, les systèmes experts peuvent être pris en défaut [Bonnet 2011, Miriagou *et al.* 2010]. Il est donc recommandé d'être attentif à toute diminution de sensibilité des entérobactéries aux carbapénèmes. Suite à ces problèmes de détection, le CLSI a abaissé de façon significative les valeurs seuils des CMI des carbapénèmes depuis 2010 pour permettre une meilleure détection des isolats produisant des carbapénémases. L'ertapénème semble être le meilleur marqueur pour la détection de la plupart des carbapénémases : la CMI pour cette molécule est généralement plus élevée proportionnellement que la CMI des autres carbapénèmes [McGettigan *et al.* 2009, Mocquet *et al.* 2011, Vading *et al.* 2010] et il a la valeur seuil la plus basse [CLSI 2012, EUCAST/CASFM 2012]. Cependant, la détection de carbapénémases ne peut se fonder uniquement sur les valeurs de CMI de l'ertapénème car cela manque de spécificité [Miriagou *et al.* 2010].

Il est conseillé de rechercher la production d'une carbapénémase chez toutes les souches présentant même une légère diminution de sensibilité aux carbapénèmes [CLSI 2012, EUCAST/CASFM 2012]. En effet, une sensibilité intermédiaire, voire même une sensibilité aux carbapénèmes ont été observées chez certaines souches productrices de carbapénémases. Ce phénotype est particulièrement retrouvé pour les OXA-48 et OXA-181 qui ne produisent pas de BLSE associée à l'oxacilline [Castanheira *et al.* 2011, Poirel *et al.* 2004]. Aucun consensus n'existe, mais il est conseillé de faire une recherche de carbapénémases chez les entérobactéries présentant des CMI > 0,5 mg/L pour l'ertapénème ou > 2 mg/L pour l'imipénème et le méropénème, c'est-à-dire pour les souches de sensibilité diminuée au

carbapénèmes selon les critères de l'EUCAST/CASFM 2012 et du CLSI 2012 [CASFM 2012, Nordmann *et al.* 2012, Poirel *et al.* 2012]. Et même si de telles CMI font parfois inclure dans ces études les espèces de la tribu des *Proteae*, notamment *Proteus mirabilis* et *Morganella morganii* (intrinsèquement moins sensibles aux carbapénèmes (notamment à l'imipénème) que les autres espèces d'entérobactéries à cause de PLP naturellement peu affines pour ces molécules), cela semble être le meilleur compromis afin d'optimiser la sensibilité de détection [CASFM 2012, Nordmann *et al.* 2012, Poirel *et al.* 2012].

Le CASFM 2012 indique, dans sa lettre d'information [Annexe 1 du CASFM 2012], que la production d'une carbapénémase doit être suspectée lorsque le diamètre d'inhibition autour du disque d'ertapénème est  $< 28$  mm ou que la CMI est  $> 0,5$  mg/L et qu'en cas de suspicion, la production de carbapénémase doit être confirmée à l'aide de techniques phénotypiques et/ou génotypiques. Plusieurs techniques phénotypiques ont été proposées, mais aucune à ce jour n'a une spécificité ou une sensibilité de 100% [CASFM 2012].

En tout cas, après l'étape habituelle de la détermination de l'antibiogramme par des méthodes automatisée ou manuelle, l'étape suivante de détection d'une activité carbapénémase est classiquement l'utilisation du test phénotypique, dit « test de Hodge », de réalisation et d'interprétation difficiles [Girlich *et al.* 2011]. Ensuite, on peut également utiliser les propriétés de chaque groupe d'enzymes pour tenter de les identifier par des tests d'inhibition (ou de synergie) par exemple. Nous allons développer ces différentes méthodes.

#### **II.3.4.1.1. Test de Hodge modifié (MHT)**

Cette technique, basée sur la production *in vivo* par une souche d'une carbapénémase [CDC 2009, CLSI, Girlich *et al.* 2011], est relativement longue car elle nécessite au moins 24-48h. Ce test peut être utilisé comme première étape dans la détection des souches dont on veut savoir si elles produisent une carbapénémase [Girlich *et al.* 2011]. En outre, il est également utile dans le cadre d'un processus de contrôle d'infection en cas d'épidémie causée par des souches productrices de carbapénémases [Nordmann *et al.* 2012].

Le test de Hodge modifié (MHT) repose sur l'utilisation d'un disque d'ertapénème 10 µg (plus indiqué que l'imipénème) et la souche de référence sensible *E. coli* ATCC 25922 ensemencée par écouvillonnage sur gélose Mueller Hinton à l'aide d'une suspension 0,5 McF diluée au 1/10<sup>ème</sup> [CASFM 2012]. Les souches test suspectées de produire une carbapénémase et des souches témoins (ex : témoin positif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 producteur de carbapénémase KPC-2 et témoin négatif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 non producteur de carbapénémase) sont ensemencées en strie depuis le disque vers le bord de la gélose sur une longueur d'au moins 20 mm. Le test est interprétable en cas de déformation de la zone d'inhibition de la souche de référence le long de la strie de la souche témoin positif. Si une déformation semblable est observée avec la souche test suspecte, celle-ci peut être considérée comme pouvant être productrice d'une carbapénémase (Figure 12). Ce test ne permet par contre pas de déterminer la classe à laquelle appartient la carbapénémase [Girlich *et al.* 2011].

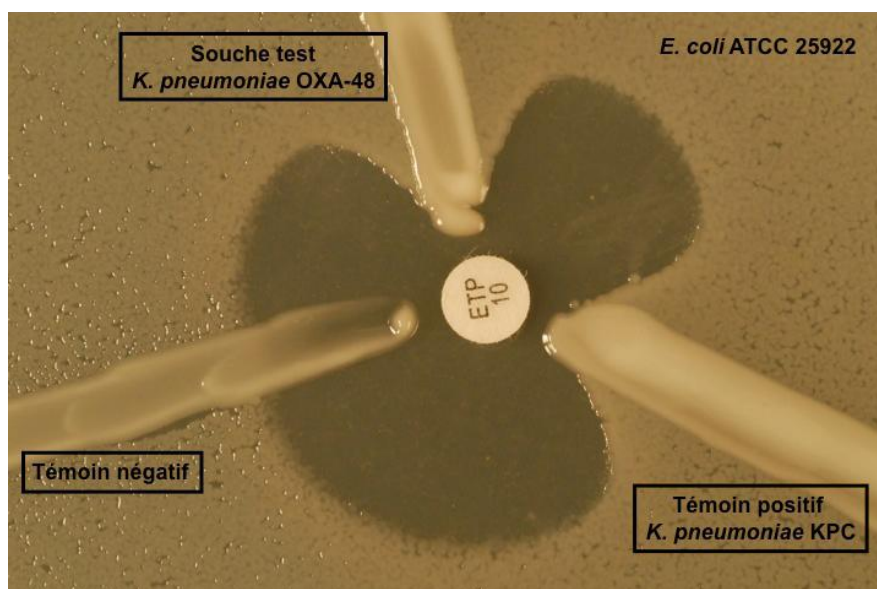


Figure 12 : Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénémases [CASFM 2012]

La suspicion de la production de carbapénémase est objectivée par une déformation de la zone d'inhibition (l'antibiotique n'est plus actif car il est inhibé par l'enzyme) autour du disque d'ertapénème 10 µg (ETP 10) de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 le long des stries correspondant au témoin positif (T+, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 produisant la carbapénémase KPC-2) et de la souche test (ici *K. pneumoniae* produisant OXA-48). La zone d'inhibition de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922, sensible aux carbapénèmes, reste inchangée au contact de la strie correspondant au témoin négatif (T-, *K. pneumoniae*

ATCC BAA-1706). En effet, l'*E. coli* ATCC 25922 ne pousse pas au niveau du disque de carbapénème car l'antibiotique inhibe son action [CASFM 2012].

Ce test manque souvent de spécificité. Par exemple, des résultats faussement positifs peuvent être observés pour des souches productrices à haut niveau d'AmpC ou encore pour des souches productrices de BLSE (CTX-M...) [Carvalhoes *et al.* 2010, Seah *et al.* 2011, Stuart *et al.* 2010]. Pour ces souches ayant un défaut d'accumulation des carbapénèmes associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE, la réalisation du test de Hodge modifié en ajoutant de la cloxacilline sur le disque d'ertapénème (déposer 10 µL d'une solution aqueuse à 75 mg/mL de cloxacilline sur le disque d'ertapénème) permet d'éliminer les faux positifs [CASFM 2012, Seah *et al.* 2011, Stuart *et al.* 2010].

Ce test peut aussi manquer de sensibilité. Par exemple des faux négatifs ont été obtenus pour des isolats producteurs de l'enzyme de type NDM-1 [Castanheira *et al.* 2011]. Pour ces souches productrices de carbapénémase de type NDM-1, l'ajout de ZnSO<sub>4</sub> (100 µg/mL) dans le milieu permet d'augmenter très notablement la sensibilité du test [CASFM 2012, Girlich *et al.* 2011, Lee *et al.* 2001]. Un test d'inhibition par des inhibiteurs spécifiques des β-lactamases de classe B (EDTA ou acide dipicolinique) est également utile dans ce cas pour confirmer le mécanisme (voir II.3.4.1.2).

En revanche, le test de Hodge donne de bons résultats pour la détection des souches productrices de KPC et d'OXA-48 [Anderson *et al.* 2007, Girlich *et al.* 2011].

#### **II.3.4.1.2. Tests d'inhibition (ou de synergie)**

Des études d'inhibition peuvent être effectuées en milieu de culture liquide ou solide avec des molécules qui inhibent l'activité des carbapénémases. Ces tests d'inhibition reposent sur la diminution de la CMI de carbapénèmes en présence d'inhibiteurs spécifiques ou sur l'augmentation du diamètre d'inhibition autour d'un disque combinant un carbapénème et un inhibiteur, ou encore sur une image de synergie entre un disque de carbapénème et un disque contenant un inhibiteur. Certains inhibiteurs manquent néanmoins de spécificité.

- **Bandelettes combinées E-test<sup>®</sup>**

La bandelette E-test<sup>®</sup> combinée (E-test<sup>®</sup> MBL, bioMérieux), comprenant un gradient de concentration d'un carbapénème avec et sans EDTA, est une des méthodes préconisées pour la mise en évidence des métallo- $\beta$ -lactamases (= MBL). Cette technique utilise l'imipénème et l'association imipénème / EDTA de chaque côté de la bandelette (Figure 13). L'EDTA contenu d'un côté de la bandelette inhibe les enzymes de classe B (= MBL) en chélatant les ions métalliques. Si après incubation, le ratio entre la CMI avec l'inhibiteur et la CMI sans l'inhibiteur est supérieur ou égal à 8, la souche est considérée comme productrice de MBL.

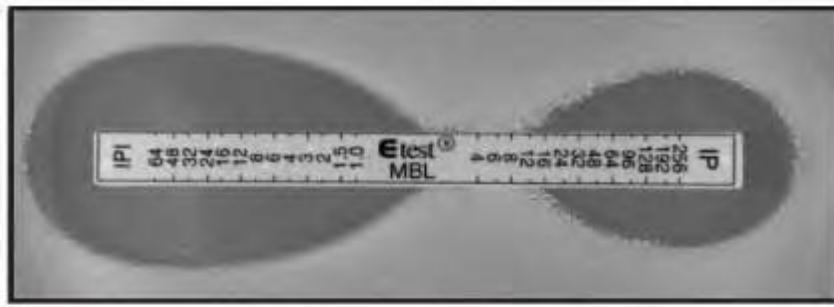


Figure 13 : E-test<sup>®</sup> MBL IP/IPI : imipénème  $\pm$  EDTA [bioMérieux]

Cette méthode est efficace pour la détection des producteurs de MBL présentant une forte résistance, mais elle peut échouer quant à la détection de souches produisant une MBL présentant un bas niveau de résistance à l'imipénème (de faux négatifs ont été rapportés pour des souches ayant une CMI de l'imipénème supérieures ou égales à 4 mg/L) [Nordmann *et al.* 2011]. De plus, l'EDTA peut avoir une activité antibactérienne intrinsèque chez certaines souches (en augmentant la perméabilité de la membrane externe) et ainsi être à l'origine de faux positifs ou gêner la lecture du test [CASFM 2012, Giske *et al.* 2011].

D'autres bandelettes E-test<sup>®</sup> combinées contenant d'autres inhibiteurs ou d'autres molécules de carbapénèmes (par exemple : méropénème  $\pm$  acide boronique pour détecter les carbapénémases de type KPC) sont développées et pourraient être bientôt disponibles en France [Halimi *et al.* 2012, Nordmann *et al.* 2012].

- **Tests d'inhibition avec disques sur milieu gélosé**

Il existe des disques combinés (disques MBL BioRad<sup>®</sup>) qui permettent de mettre en évidence les MBL, comme précédemment avec les E-tests<sup>®</sup> combinés, en utilisant l'EDTA comme inhibiteur [Giske *et al.* 2011, Nordmann *et al.* 2011, Seah *et al.* 2001] et en observant une possible augmentation du diamètre d'inhibition sur le disque avec inhibiteur par rapport à l'autre contenant le carbapénème seul. La production de carbapénémase de classe B peut également être suspectée si une image de synergie est observée entre un disque d'EDTA et un disque d'imipénème placés sur une gélose l'un en face de l'autre. Il est préconisé d'inclure une distance centre à centre inférieure à 3 cm entre les disques [Lee *et al.* 2001, Miriagou *et al.* 2010, Vading *et al.* 2010].

Les acides boroniques peuvent, quant à eux, être utilisés comme inhibiteurs, pour détecter les enzymes de classe A (comme celles de type KPC) versus un carbapénème [Giske *et al.* 2011, Seah *et al.* 2001]. Par contre, ils peuvent inhiber les céphalosporinases AmpC. Les tests phénotypiques les utilisant ont donc quelques limites pour l'identification des carbapénémases chez les espèces d'entérobactéries pouvant produire une AmpC [Seah *et al.* 2001]. Pour pallier ce problème, on peut tester ces antibiotiques sur un milieu contenant de la cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase) et, comparativement sur un milieu sans cloxacilline. On va alors détecter une résistance aux carbapénèmes non liée à la production d'une carbapénémase, mais à une céphalosporinase hyperproduite ou à l'association de céphalosporinase et de défaut d'accumulation des carbapénèmes (impermeabilité...) si on voit une augmentation importante des diamètres d'inhibition sur le milieu avec cloxacilline. En effet, en levant l'action de la céphalosporinase AmpC grâce à la cloxacilline, on retrouvera la sensibilité aux carbapénèmes. L'inhibition de l'activité céphalosporinase de l'AmpC peut aussi être obtenue en utilisant des comprimés contenant de la cloxacilline [CASFM 2012, Giske *et al.* 2011, Seah *et al.* 2001].

Il existe des méthodes commercialisées basées sur ces concepts de synergie entre molécules [Giske *et al.* 2011]. Par exemple, le kit Rosco Diagnostica<sup>®</sup> (Rosco Diagnostica) s'appuie sur ces modèles. C'est une méthode manuelle de diffusion sur gélose MH (inoculum bactérien de 0,5 McF) à l'aide de comprimés contenant 10 µg de méropénème (MRP10 ou MR) et plus ou moins les molécules d'acide dipicolinique (DP), d'acide boronique (BO) et de

cloxacilline (CX) (Figure 14). L'utilisation de l'acide dipicolinique pour la détection des MBL permet de s'affranchir de l'inconvénient d'une éventuelle activité antibactérienne intrinsèque de l'EDTA et donc d'un risque de résultat faussement positif. L'acide boronique, comme nous l'avons précisé, présente une très bonne sensibilité pour la détection des enzymes de type KPC. Cette molécule permet aussi de détecter les souches présentant une hyperproduction de l'enzyme de type AmpC ; mais dans ce cas, il y a aussi une synergie avec la cloxacilline. Ce kit permet donc la mise en évidence de trois types de  $\beta$ -lactamases pour des souches présentant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes, dont deux types de carbapénémases : KPC (classe A) et carbapénémases de classe B (MBL), ainsi que les céphalosporinases AmpC (quand celles-ci sont hyperproduites ou associées à un autre mécanisme de résistance tel que la modification de porines ou une autre  $\beta$ -lactamase). Le tableau ci-dessous (Tableau 9) résume l'interprétation des résultats obtenus avec ce kit.

		MR+BO	MR+DP	MR+CX
<u>AmpC + perte porine</u>	MRP 10	$\geq 5\text{mm}$ et $\rightarrow$	$\leq 3\text{mm}$	$\geq 5\text{mm}$
KPC	MRP 10	$\geq 5\text{mm}$	$\leq 3\text{mm}$	$\leq 3\text{mm}$
MBL	MRP 10	$\leq 3\text{mm}$	$\geq 5\text{mm}$	$\leq 3\text{mm}$

Tableau 9 : Interprétation des résultats du kit Rosco Diagnostica<sup>®</sup>, après les 24h d'incubation nécessaires, par la mesure des diamètres d'inhibition autour de chaque comprimé et la comparaison de la différence entre les différents diamètres (méro-pénème 10  $\mu\text{g}$  « MRP10 ou MR », acide boronique « BO », acide dipicolinique « DP », cloxacilline « CX »)

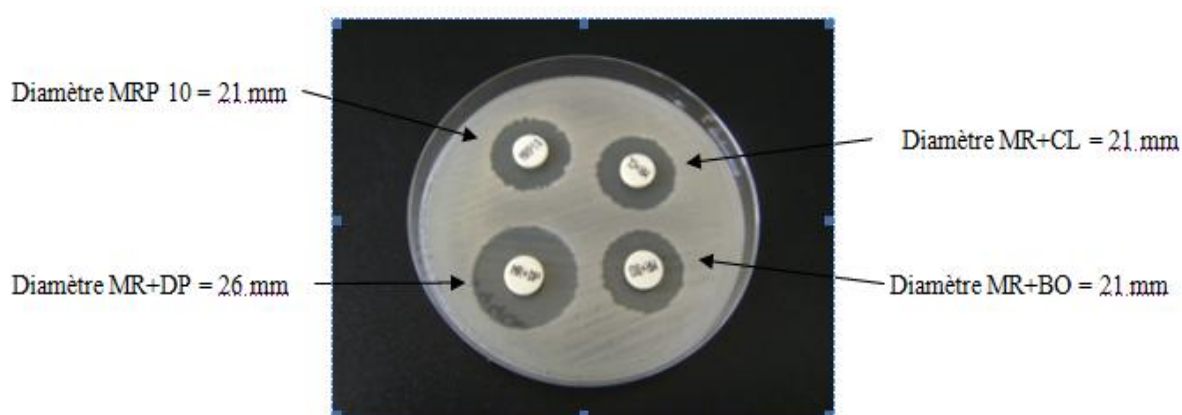


Figure 14 : Exemple de souche productrice de métallo- $\beta$ -lactamase : différence de diamètre entre « MR+DP » et « MRP10 » égale à 5 mm.

A ce jour, il n'existe pas de test d'inhibition spécifique des carbapénémases de classe D [Grall *et al.* 2011, Miriagou *et al.* 2010]. Par exemple, OXA-48 et OXA-181 ne sont inhibées ni par les IBL (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam) ni par les agents chélateurs de zinc (comme l'EDTA). Le NXL104 peut parfois inhiber des enzymes de type OXA-48, mais ne peut tout de même pas être utilisé à cause de son manque de spécificité [Poirel *et al.* 2012]. La production de ces enzymes est suspectée si tous les tests d'inhibition cités auparavant sont négatifs ; dans ce cas le test de Hodge est particulièrement utile. Cependant, il a été montré qu'un haut niveau de résistance à la fois à la témocilline, dérivé de la ticarcilline non commercialisé en France (CMI > 64 mg/L) [Glupczynski *et al.* 2012], et à l'association pipéracilline-tazobactam chez les entérobactéries montrant une sensibilité réduite ou une résistance à au moins l'un des carbapénèmes pourrait être utilisé en tant que première étape de détection pour l'identification de souches productrices d'OXA-48 par exemple [Poirel *et al.* 2012], mais cela reste à étudier [Nordmann *et al.* 2012].

#### **II.3.4.1.3. Méthodes spectrophotométriques**

La détection des carbapénémases par méthode spectrophotométrique, avec par exemple le spectromètre de masse Maldi-Tof<sup>®</sup> (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight ; laser assisté par matrice, désorption/ ionisation de temps de vol), semble être l'approche la plus précise préconisée [Burckhardt *et al.* 2011, Carbonnelle *et al.* 2011, Hrabak *et al.* 2011, Hrabak *et al.* 2012, Sparbier *et al.* 2012, Walkova *et al.* 2012].

Cette technique est basée sur la détection d'un carbapénème, puis sur sa disparition (imipénème, méropénème) et parfois même sur l'analyse du spectre des produits de dégradation de l'antibiotique (ertapénème) [Cuzon *et al.* 2008, Sparbier *et al.* 2012] introduit dans une culture bactérienne produisant une carbapénémase [Poirel *et al.* 2012]. Elle permet la distinction entre les bactéries productrices de carbapénémases et les souches résistantes aux carbapénèmes par d'autres mécanismes (impermeabilité, hyperproduction de céphalosporinases et/ou BLSE) [Burckhardt *et al.* 2011, Nordmann *et al.* 2012, Sparbier *et al.* 2012]. Le système va détecter dans un premier temps le carbapénème ; ensuite, la dégradation



de l'antibiotique va être mise en évidence par sa disparition au contact de la carbapénémase qui va le détruire (étude des variations au niveau des spectres engendrés par l'hydrolyse de l'antibiotique). Pour l'ertapénème, l'apparition des produits de dégradation sera même détectée par le système. Contrairement aux méthodes bactériologiques classiques où on étudie la croissance bactérienne au contact de l'antibiotique, ici c'est la réaction enzymatique, produite ou non, qui dégrade l'antibiotique et permet de savoir s'il y a présence de l'enzyme recherchée. A chaque test, une suspension bactérienne, connue pour ne pas être productrice de carbapénémase, est analysée en parallèle et permet la comparaison des spectres obtenus pour les souches testées par rapport à ce contrôle négatif.

Cette méthode est quand même longue à cause de l'étape préliminaire d'au moins 12h pour obtenir la culture bactérienne [Sparbier *et al.* 2012] et nécessite un protocole de préparation des échantillons. Pour certains antibiotiques, la lecture des produits de dégradation par le Maldi-Tof<sup>®</sup> peut poser problème (ex : molécules difficiles à ioniser, fixation de molécules entre elles...) et le changement du protocole initial ou la détermination de droites de calibration peuvent permettre de résoudre ce problème [Hrabak *et al.* 2012, Sparbier *et al.* 2012] ; et même parfois de diminuer le temps de préparation de l'échantillon pour rendre les résultats en 1 à 2,5h une fois la culture obtenue [Burckhardt *et al.* 2011].

Cette technique n'est pas chère en comparaison des techniques moléculaires disponibles. Cependant, elle nécessite, d'une part, de posséder le matériel nécessaire et, d'autre part, une formation spécifique pour l'utilisation du spectrophotomètre ainsi que pour l'analyse des résultats grâce aux spectres obtenus.

L'inconvénient principal vient du fait qu'elle ne permet pas de dire quel type de carbapénémase est produit par la souche. Cependant, elle présente une sensibilité et une spécificité excellentes pour détecter la production de carbapénémases par les entérobactéries, y compris l'OXA-48 [Hrabak *et al.* 2012]. Elle devrait être mise en œuvre dans les laboratoires de référence, mais doit être encore évaluée avant cela et adaptée pour une utilisation en routine [Miriagou *et al.* 2010, Nordmann *et al.* 2012].

### II.3.4.2. Dépistage des porteurs de souches productrices de carbapénémase

La prévention de la propagation des souches productrices de carbapénémases repose sur la détection précoce et précise des porteurs dans les unités hospitalières ou à l'admission / sortie, soit de l'hôpital soit d'une unité particulière. La question principale reste de savoir qui doit se faire dépister. Plusieurs pays ont introduit des recommandations, mais elles diffèrent considérablement. Le dépistage (ou « screening ») devrait inclure au moins les patients « à risque » c'est-à-dire ceux venant des soins intensifs ou de transplantation et les sujets immunodéprimés. Et si un patient est confirmé comme étant infecté ou colonisé par une souche productrice de carbapénémase, le programme de dépistage devrait être étendu aux patients du même service. Le dépistage doit être effectué au moins pour les patients transférés d'un hôpital étranger et également pour les patients ayant été au contact d'un patient infecté / colonisé connu. Cela oblige à un suivi précis des cas de BMR. Néanmoins, on sait maintenant que des souches isolées chez certains patients ne sont pas en rapport avec un séjour à l'étranger ; les recommandations restent difficiles à définir.

Comme le réservoir d'entérobactéries est essentiellement la flore intestinale, les selles et les écouvillonnages rectaux sont les prélèvements les plus appropriés pour effectuer ces dépistages et alors prévenir ou circonscrire une épidémie naissante [Adler *et al.* 2011, Vrioni *et al.* 2012]. Le screening peut être aussi utile lors de la gestion d'une épidémie ou la recherche de porteurs supplémentaires quand la souche productrice de carbapénémase se trouve dans les selles. L'inconvénient principal de l'étape de culture est qu'elle retarde encore le délai de rendu des résultats de 18-24h. Ainsi, le temps nécessaire pour confirmer ou infirmer une activité de carbapénémase peut aller jusqu'à 72h après que l'échantillon ait été prélevé chez le patient.

Les prélèvements sont ensemencés sur ces milieux de screening (gélose sélective), soit directement, soit avec un bouillon d'enrichissement contenant par exemple 0,5 à 2 mg/L d'imipénème ou 0,5 mg/L d'ertapénème [Adler *et al.* 2011, Landman *et al.* 2005, Pirs *et al.* 2011]. Les avantages du bouillon d'enrichissement n'ont pas été encore suffisamment évalués, mais il a été montré que cela pouvait améliorer la détection des souches productrices de carbapénémases de type KPC par exemple [Adler *et al.* 2011]. Cela pourrait également

permettre une détection plus efficace des souches productrices de carbapénémases à faible niveau de résistance, comme par exemple les OXA-48 et OXA-181. On peut s'attendre, dans ce cas, à une bonne spécificité, mais à une sensibilité assez pauvre [Nordmann *et al.* 2012].

- **Milieux de screening ChromID ESBL<sup>®</sup>, CHROMagar KPC<sup>®</sup> et SUPERCARBA<sup>®</sup>**

Le milieu de culture initialement conçu pour détecter les souches productrices de BLSE et contenant une céphalosporine sélective, la cefpodoxime (ChromID ESBL<sup>®</sup>, bioMérieux, France) et un autre milieu contenant un carbapénème (CHROMagar KPC<sup>®</sup>, Chromagar, France) ont été évalués quant à la détection des souches productrices de carbapénémases [Carrër *et al.* 2010, Nordmann *et al.* 2011]. Ces deux milieux contiennent des molécules chromogènes qui peuvent aider à la reconnaissance des entérobactéries.

Le milieu ChromID ESBL<sup>®</sup> permet une détection de toute souche ayant un certain degré de résistance aux céphalosporines ; comme on sait que la plupart des souches produisant une carbapénémase (à l'exception des oxacillinases par exemple) sont également résistantes aux céphalosporines, soit de par leur propre spectre d'activité, soit par leur association à une BLSE, cela peut ainsi aider à leur détection. Même si le milieu ChromID ESBL<sup>®</sup> a une excellente sensibilité, son principal inconvénient est donc son manque de détection pour des souches productrices de carbapénémases sensibles à la cefpodoxime (comme l'OXA-48) quand elles ne produisent pas de BLSE associée [Carrër *et al.* 2010, Nordmann *et al.* 2012]. Il manque aussi de spécificité pour la détection des souches productrices de carbapénémases puisqu'il avait été formulé initialement pour détecter les souches productrices de BLSE. Cette considération est à prendre en compte au vu du nombre d'entérobactéries productrices de BLSE de par le monde et nécessite des essais complémentaires sur les colonies isolées sur la gélose sélective pour savoir si elles produisent bien une carbapénémase [Nordmann *et al.* 2012].

Le milieu CHROMagar KPC<sup>®</sup> détecte bien les souches productrices de carbapénémases si elles présentent un très haut niveau de résistance aux carbapénèmes [Samra *et al.* 2008]. Son principal inconvénient est, par conséquent, son manque de sensibilité, car il peut ne pas

détecter les souches productrices de carbapénémases ayant de faibles niveaux de résistance aux carbapénèmes, comme c'est le cas de l'OXA-48 [Carrër *et al.* 2010].

Le nouveau milieu SUPERCARBA<sup>®</sup>, contenant de la cloxacilline, du zinc et une molécule de carbapénème, qui améliore la sensibilité et la spécificité pour la détection de tous les types de souches productrices de carbapénémases (y compris l'OXA-48), a été récemment mis au point [Nordmann *et al.* 2012]. Ce milieu est le premier milieu de screening qui semblerait détecter à la fois les isolats producteurs d'enzymes de type KPC ou métallo-β-lactamases, mais aussi les souches productrices d'OXA-48, et en particulier même celles qui ne sont pas associées à une BLSE [Nordmann *et al.* 2012]. SUPERCARBA<sup>®</sup> contient en effet une petite concentration de carbapénème qui permettrait la détection de souches productrices de carbapénémases avec un bas niveau de résistance aux carbapénèmes ; ce qui est d'ailleurs la situation la plus fréquente pour les enzymes de type OXA-48. De plus, ce milieu permettrait également de sélectionner seules les souches productrices de carbapénémases dans des prélèvements pouvant déjà certainement contenir des bactéries productrices de BLSE (étant donné leur forte prévalence) ; la croissance de ces dernières serait inhibée par la molécule de carbapénème contenue dans le milieu [Nordmann *et al.* 2012]. Le fait d'inhiber les BLSE est en effet tout aussi important au vu de l'émergence sans cesse en évolution de souches productrices de telles enzymes au niveau mondial et du fait qu'elles peuvent empêcher une bonne détection des carbapénémases en les occultant.

Ce milieu SUPERCARBA<sup>®</sup> semble donc être une bonne méthode à utiliser en complément des autres milieux de screening. Ce milieu permettrait une détection des OXA-48 [Girlich *et al.* 2012] à faible concentration (cut off :  $\leq 10^3$ ) et non nécessairement associées à une BLSE par rapport aux deux autres milieux qui les détectent parfois, mais à des concentrations beaucoup plus fortes [Nordmann *et al.* 2012]. De plus, ce milieu semble être plus spécifique que le milieu ChromID ESBL<sup>®</sup> qui rend parfois des faux positifs [Vrioni *et al.* 2012]. La sensibilité de SUPERCARBA<sup>®</sup> a été évaluée à 95,6% et la spécificité à 82% [Nordmann *et al.* 2012]. Le problème reste l'absence de molécule chromogénique pour l'identification de l'entérobactérie productrice de la carbapénémase [Girlich *et al.* 2012, Nordmann *et al.* 2012].

- **Milieu de screening ChromID CARBA<sup>®</sup> (bioMérieux)**

Ce nouveau milieu chromogène de screening est disponible depuis peu et semble donner des résultats prometteurs [Vrioni *et al.* 2012, Wilkinson *et al.* 2012] y compris pour OXA-48 [Bereksi *et al.* 2012]. Sa sensibilité a été évaluée à 92,4 %, identique à celle de ChromID ESBL<sup>®</sup>, par rapport à d'autres méthodes de screening des EPC dans des prélèvements rectaux, avec ou sans enrichissement [Vrioni *et al.* 2012]. Elle est supérieure à celle de CHROMagar KPC<sup>®</sup> (96,1% ou 89,9% versus 89%) [Bereksi *et al.* 2012]. Sa spécificité semble être très bonne également, à hauteur de 96,9% versus 84,7% pour ChromID ESBL<sup>®</sup> [Vrioni *et al.* 2012] et 97% ou 94% versus 94% pour CHROMagar KPC<sup>®</sup> [Bereksi *et al.* 2012].

Ces différents milieux permettent une détection de souches de colonisation. Ils ont leur importance dans le processus de dépistage qui exige aux patients d'être maintenus en isolement strict avant l'obtention des résultats. Aucune des approches basées sur la culture ne permettra à elle seule d'identifier le type de carbapénémase. Cette étape de screening doit quand même être suivie d'une étape d'identification des souches productrices de carbapénémases par techniques phénotypiques (comme celles citées auparavant) et techniques génotypiques. Les tests commerciaux basés sur des techniques génotypiques sont en plein développement. Ils sont proposés, par exemple, pour la détection rapide, directement sur les échantillons de selles [Nordmann *et al.* 2012], des producteurs de divers types de carbapénémases (KPC, NDM-1, OXA...) par PCR multiplex [CDC 2010, Mostachio *et al.* 2009, Poirel *et al.* 2011]. Les biopuces à ADN sont également en plein essor (par exemple les kits « Chek MDR<sup>®</sup> » [Naas *et al.* 2011]). Ces méthodes permettraient d'accélérer la détection, et pourraient être particulièrement utiles dans les enquêtes épidémiologiques. Toutefois, le rapport coût-efficacité de ces approches doit être considéré.

# **III – Caractérisation phénotypique des souches isolées lors de l'épidémie OXA-48 au CHU de Nancy en 2009/2011**

## **III.1. Objectif**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la détection phénotypique de souches produisant une carbapénémase de type OXA-48. L'objectif de notre étude a été de caractériser des souches responsables d'une épidémie à l'aide de différentes méthodes phénotypiques utilisables par tout laboratoire en routine, à savoir une technique semi-automatisée en milieu liquide (Vitek2<sup>®</sup>) et deux techniques manuelles de diffusion en gélose (disques Oxoïd<sup>®</sup> et E-tests<sup>®</sup>). Nous avons analysé les résultats, d'une part afin d'évaluer les performances de différentes méthodes utilisées dans un cadre expérimental, et d'autre part afin de les comparer à ceux obtenus antérieurement en routine lors de l'épidémie.

## **III.2. Matériels et Méthodes**

### **III.2.1 Souches**

Au total, 43 souches d'entérobactéries productrices d'OXA-48 ont été incluses dans ce travail dont 38 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 2 *E. coli*, 1 *E. cloacae* et 1 *E. aerogenes* (Tableau 10). Parmi ces souches, 42 avaient été isolées de décembre 2009 à mars 2011 durant une épidémie (diffusion d'un clone de *K. pneumoniae* producteur d'OXA-48 et de BLSE de type CTX-M15 du groupe 1) ayant eu lieu au CHU de Nancy et dans sa région en 2009/2011. Une autre souche d'*E. coli* productrice d'OXA-48 et de BLSE CTX-M9 du groupe 9 [CNQ AFSSAPS « 11BAC1 », avril 2011] a également été incluse. Il est à souligner que la caractérisation génotypique de ces isolats a été réalisée au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy à l'aide d'une technique d'amplification/hybridation sur puces (kit « Check MDR CT102<sup>®</sup> », Check-points, Biocentrics) et de PCR spécifiques suivies de séquençage.

N°	Espèces	Pulsotype	CTX-M15	Origine
1	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
2	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
3	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
4	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
5	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
6	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
7	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
8	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
9	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
10	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
11	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
12	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
13	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
14	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
15	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
16	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
17	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
18	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
19	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CH
20	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
21	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
22	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
23	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
24	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
25	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
26	<i>E. coli</i>	B	-	CHUN
27	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
28	<i>K. pneumoniae</i>	ND	+	CHUN
29	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CH
30	<i>K. pneumoniae</i>	C	-	CHUN
31	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
32	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
33	<i>K. pneumoniae</i>	A	+	CHUN
34	<i>K. pneumoniae</i>	ND	+	CHUN
35	<i>K. pneumoniae</i>	ND	+	CH
36	<i>K. pneumoniae</i>	ND	+	CH
37	<i>E. cloacae</i>	ND	-	CHUN
38	<i>K. oxytoca</i>	ND	-	CHUN
39	<i>K. pneumoniae</i>	ND	+	CHUN
40	<i>K. pneumoniae</i>	ND	+	CHUN
41	<i>E. aerogenes</i>	ND	-	CHUN
42	<i>K. pneumoniae</i>	ND	-	CHUN
43	<i>E. coli</i>	ND	-	AFSSAPS

Tableau 10 : Caractéristiques des souches d'entérobactéries OXA-48 de l'étude (espèces, pulsotype,  $\beta$ -lactamase CTX-M15 associée ou non et origine du prélèvement)

Parmi les 42 souches épidémiques d'entérobactéries OXA-48, 1 avait été isolée de l'environnement (un matelas du CHUN, n°27). Les autres souches avaient été obtenues de 34 patients du CHU de Nancy et d'un autre établissement de la région.

Parmi les 38 souches de *K. pneumoniae*, l'étude par électrophorèse en champ pulsé a révélé la présence d'un clone prédominant (pulsotype A).

La présence du gène *bla*<sub>CTX-M15</sub> a été observée pour 36 des 43 souches d'entérobactéries.

### **III.2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par différentes méthodes phénotypiques**

Les méthodes utilisées dans notre étude étaient celles disponibles au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy, à savoir une méthode semi-automatisée (Vitek2<sup>®</sup>, bioMérieux) et deux méthodes manuelles (méthodes de diffusion sur gélose avec disques ou E-test<sup>®</sup>). A l'aide de ces méthodes manuelles, quatre carbapénèmes ont été testés (imipénème, méropénème, ertapénème et doripénème).

#### **III.2.2.1. Préparation de l'inoculum**

Pour notre étude, les subcultures ont été obtenues par repiquage des aliquotes des 43 souches (congelées au préalable à -80°C) sur des géloses au sang de mouton type TSS<sup>®</sup> (bioMérieux). Ces milieux ont été incubés à 37°C pendant 24h en atmosphère normale aérobie. La pureté des souches a été vérifiée par examen macroscopique des cultures ainsi obtenues. Pour chacune des souches étudiées, les inoculums bactériens ont été réalisés après mise en suspension des colonies dans une solution saline stérile (API NaCl 0,85 % Medium 2 mL, bioMérieux) et ajustés à 0,5 McFarland à l'aide d'un densitomètre (Densichek<sup>®</sup>, bioMérieux). Les différents tests phénotypiques de l'étude ont été réalisés à partir de cette même suspension bactérienne.



### **III.2.2.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques à l'aide du système Vitek2<sup>®</sup> (bioMérieux) (logiciel 04.02)**

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée à l'aide de la carte antibiogramme AST-N103 standard Gram-négatifs<sup>®</sup>. Les résultats bruts ont été obtenus après une incubation maximale de 18h. Il est à noter que cette carte intègre l'imipénème et l'ertapénème dans son panel d'antibiotiques des carbapénèmes.

### **III.2.2.3. Etude de la sensibilité aux carbapénèmes par la méthode de diffusion en gélose avec les bandelettes E-test<sup>®</sup>**

L'ensemencement des 43 suspensions bactériennes (0,5 McF) a été réalisé à l'aide d'écouvillons stériles sur boîtes rondes Mueller Hinton (MH). Les bandelettes E-tests<sup>®</sup> ont été apposées tête-bêche 2 par 2 sur deux géloses MH différentes (méro-pénème/impénème et ertapénème/doripénème). Les géloses ont ensuite été incubées à 37°C durant 24h en atmosphère normale aérobie. La lecture a été réalisée selon les recommandations du fabricant, c'est-à-dire après 24h d'incubation. Afin de détecter une éventuelle résistance hétérogène et/ou une expression plus tardive de la résistance aux carbapénèmes, la lecture a été répétée à 48h et à 72h.

### **III.2.2.4. Etude de la sensibilité aux carbapénèmes par la méthode de diffusion en gélose avec les disques**

L'étude de la sensibilité par la méthode de diffusion en gélose avec disques a été réalisée selon les recommandations du CASFM [CASFM 2012]. L'ensemencement de la suspension bactérienne (0,5 McF) des 43 souches a été réalisé à l'aide d'écouvillons stériles sur boîtes rondes Mueller Hinton MH et les disques Oxoid<sup>®</sup> ont été déposés de manière suffisamment éloignés les uns des autres pour lire ultérieurement les diamètres d'inhibition (1

boite pour les 4 disques). Les géloses ont été incubées à 37°C durant 24h en atmosphère normale aérobie et les diamètres d'inhibition obtenus ont été mesurés à 24h et également, pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment, à 48h et 72h.

### III.2.2.5. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats a été réalisée selon les recommandations 2012 (Tableau 11) du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [CASFM 2012].

Antibiotiques	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15
Ertapénème	10 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 28	< 26
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19

Tableau 11 : Concentrations et diamètres critiques pour des souches d'entérobactéries pour les carbapénèmes [CASFM 2012]

Il est à souligner qu'en ce qui concerne les carbapénèmes, l'ertapénème a été rajouté à la liste standard des antibiotiques à tester pour les souches d'entérobactéries (versus [CASFM 2010]) afin de tenir compte de l'émergence récente de souches productrices de carbapénémases. Pour cette même raison, une note relative aux carbapénèmes a été ajoutée dans la version 2012 du CASFM (« lettre d'information concernant la détection de la production de carbapénémases chez les entérobactéries ») (versus [CASFM 2011]) [Annexe 1 du CASFM 2012].

### III.3. Résultats

#### III.3.1. Sensibilité aux carbapénèmes

##### III.3.1.1. Comparaison des CMI obtenues pour les souches de *K. pneumoniae* OXA-48 grâce au système Vitek2® (logiciel 04.02) : travail expérimental versus analyses de routine

Nous avons voulu comparer les résultats de la méthode phénotypique semi-automatisée (Vitek2® (logiciel 04.02), carte antibiogramme AST-N103) obtenus au fil du temps en routine avec ceux obtenus selon la même méthode dans les conditions de l'étude, à savoir : le même jour, par le même opérateur, dans les mêmes conditions ; d'une part, pour voir s'il existait des variations par rapport aux données obtenues en routine et d'autre part, pour évaluer cette méthode phénotypique dans des conditions de reproductibilité les meilleures possibles en s'appuyant sur les valeurs critiques des CMI pour l'imipénème et l'ertapénème chez les entérobactéries selon le CASFM [CASFM 2012].

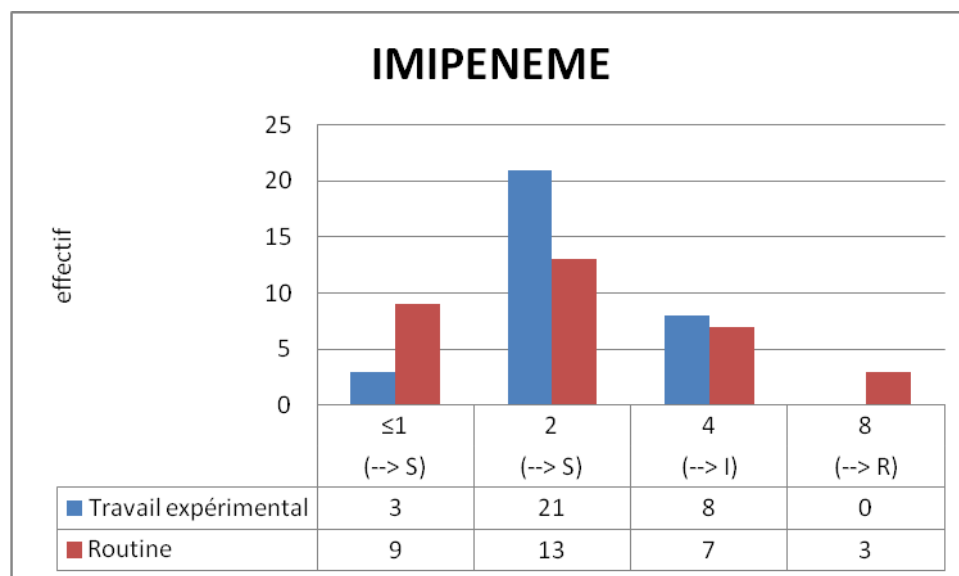


Figure 15 : Distribution des CMI (Vitek2®) d'imipénème (en mg/L) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=32)

La comparaison porte sur 32 souches de *K. pneumoniae* étant donné que certains résultats de routine n'étaient pas disponibles.

Dans le travail expérimental, des CMI comprises entre 2 et 4 mg/L ont été observées (même si 3 sont dans la catégorie  $\leq 1$  mg/L), alors que les résultats obtenus en routine objectivaient des CMI plus dispersées (entre  $\leq 1$  et 8 mg/L). Néanmoins, dans les deux cas, une CMI à 2 mg/L pour l'imipénème était la plus fréquemment observée.

Sur la base de ces données brutes, 24 souches ont été catégorisées « S » dans notre étude versus 22 en routine pour l'imipénème (Figure 15).

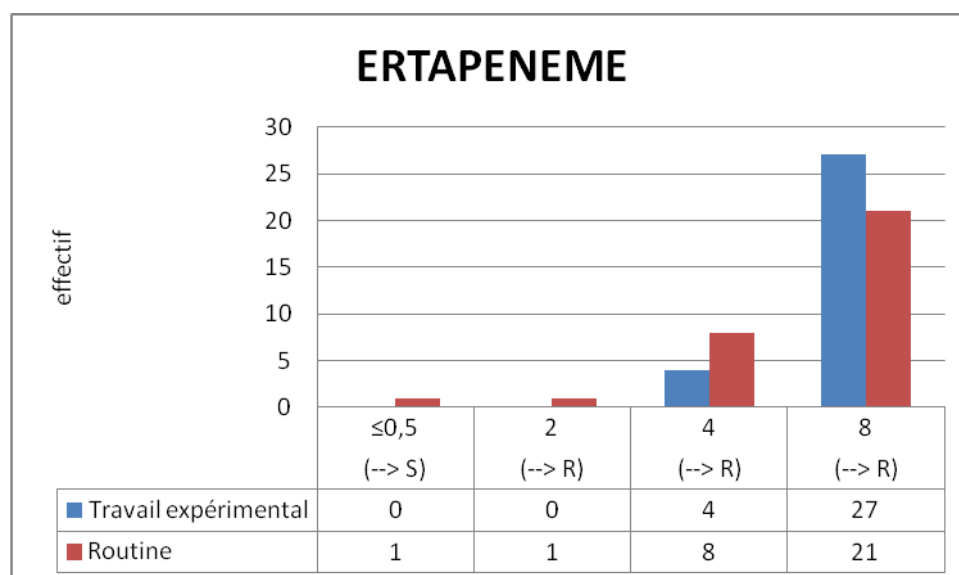


Figure 16 : Distribution des CMI (Vitek2<sup>®</sup>) d'ertapénème (en mg/L) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=31)

La comparaison porte sur 31 souches de *K. pneumoniae* étant donné que certains résultats de routine n'étaient pas disponibles.

Dans le travail expérimental, les CMI obtenues étaient pour la plupart à 8 mg/L (avec seulement 4 souches avec des CMI à 4 mg/L), alors que des CMI dispersées de  $\leq 0,5$  à 8 mg/L ont été observées en routine, même si elles étaient le plus fréquemment comprises entre 4 et 8

mg/L. La dispersion des CMI était donc nettement plus importante en routine. Néanmoins, dans les deux cas, une CMI à 8 mg/L pour l'ertapénème était la plus fréquemment observée.

Sur la base de ces données brutes, toutes les souches de notre étude ont été catégorisées « R », alors que seule une souche a été catégorisée « S » en routine pour l'ertapénème (Figure 16).

Pour l'ertapénème, il existe une moins grande variation des valeurs obtenues entre le travail expérimental et la routine que pour l'imipénème. De plus, les valeurs de CMI obtenues pour l'ertapénème sont beaucoup moins dispersées que celles obtenues pour l'imipénème ; en effet, la plupart des souches de *K. pneumoniae* ont une CMI pour l'ertapénème à 8 mg/L, alors que les valeurs de CMI pour l'imipénème sont très variables. A noter également, que pour l'ertapénème, la dispersion des CMI obtenues « étude versus routine » est encore moins importante dans notre étude qu'en routine. Cela est probablement dû en partie à une meilleure reproductibilité dans les conditions de notre étude (même jour, même opérateur), là où la routine souffre d'une plus grande dispersion, du fait du caractère aléatoire des conditions opératoires sur une grande période. L'ertapénème permet de catégoriser toutes les souches de *K. pneumoniae* « R » de l'étude et une seule en routine est catégorisée « S » (souche de *K. pneumoniae* n°6 productrice de BLSE CTX-M15 associée à l'OXA-48 : CMI  $\leq 0,5$  mg/L). L'ertapénème est donc, pour la méthode automatisée avec Vitek2<sup>®</sup>, le meilleur marqueur entre l'imipénème et l'ertapénème pour la détection des souches de *K. pneumoniae* produisant une carbapénémase de type OXA-48.

### **III.3.1.2. Comparaison des CMI obtenues par la méthode des E-tests<sup>®</sup>**

Pour ce qui est de la première méthode phénotypique manuelle de diffusion en gélose (bandelettes E-tests<sup>®</sup>), nous avons voulu voir d'une part s'il existait des variations par rapport à la méthode semi-automatisée et si cette méthode confirmait bien que l'ertapénème était le meilleur marqueur de détection des carbapénémases de type OXA-48. D'autre part, nous avons voulu comparer les différentes lectures à 24h, 48h et 72h afin de voir l'apport de ces lectures répétées quant aux interprétations de la sensibilité aux quatre carbapénèmes obtenues par cette méthode.

### III.3.1.2.1. Souches de *K. pneumoniae* OXA-48

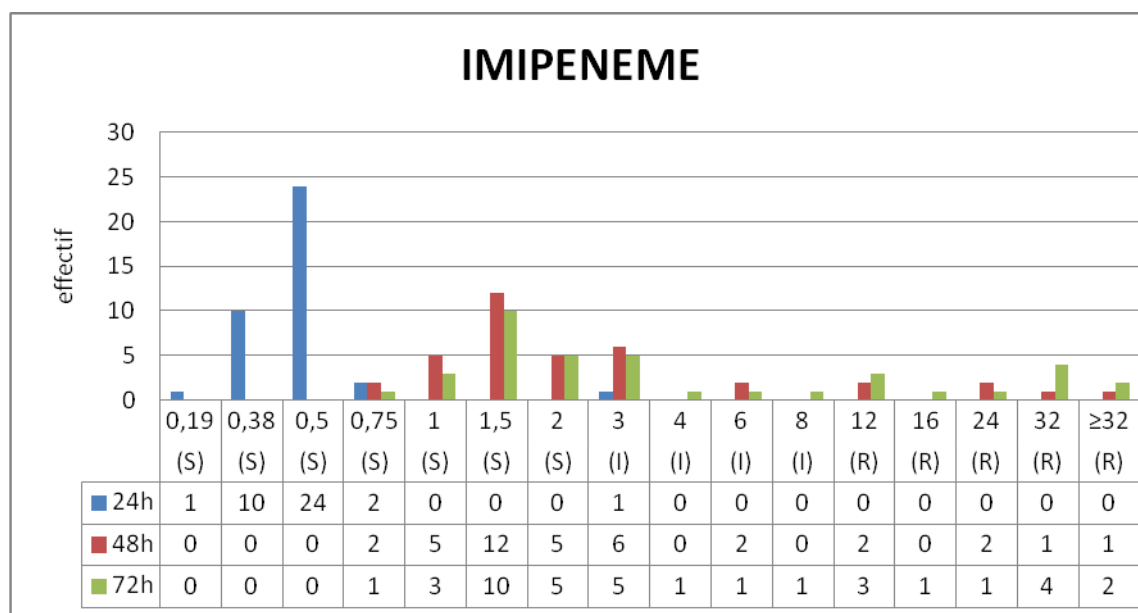


Figure 17 : Distribution des CMI (E-test<sup>®</sup>) d'imipénème (en mg/L) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour l'imipénème, 37 souches ont été catégorisées « S » à 24h et 1 « I » à 24h. A 48h, 24 souches ont été catégorisées « S » et 14 « I » ou « R ». Enfin à 72h, 19 souches ont été catégorisées « I » ou « R » et 19 toujours « S » (Figure 17).

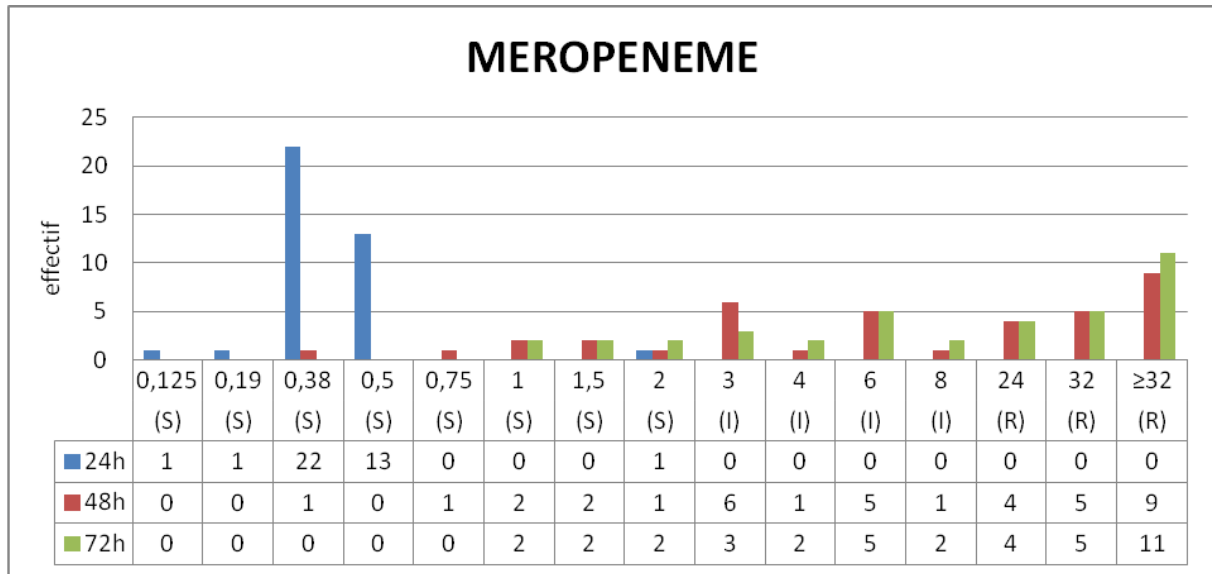


Figure 18 : Distribution des CMI (E-test<sup>®</sup>) de méropénème (en mg/L) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour le méropénème, les 38 souches ont été catégorisées « S » à 24h. A 48h, 7 souches ont été catégorisées « S » et 31 « I » ou « R ». Enfin à 72h, 32 souches ont été catégorisées « I » ou « R » et 6 toujours « S » (Figure 18).

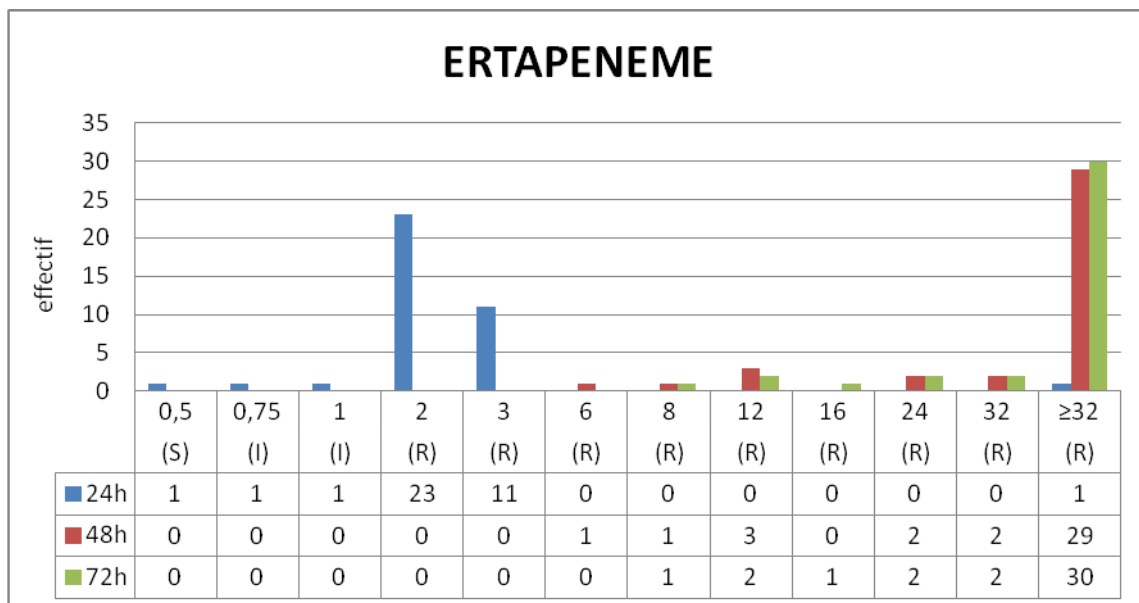


Figure 19 : Distribution des CMI (E-test<sup>®</sup>) d'ertapénème (en mg/L) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour l'ertapénème, seule 1 souche a été catégorisée « S » à 24h. A 48h, les 38 souches ont toutes été catégorisées « R » (Figure 19).

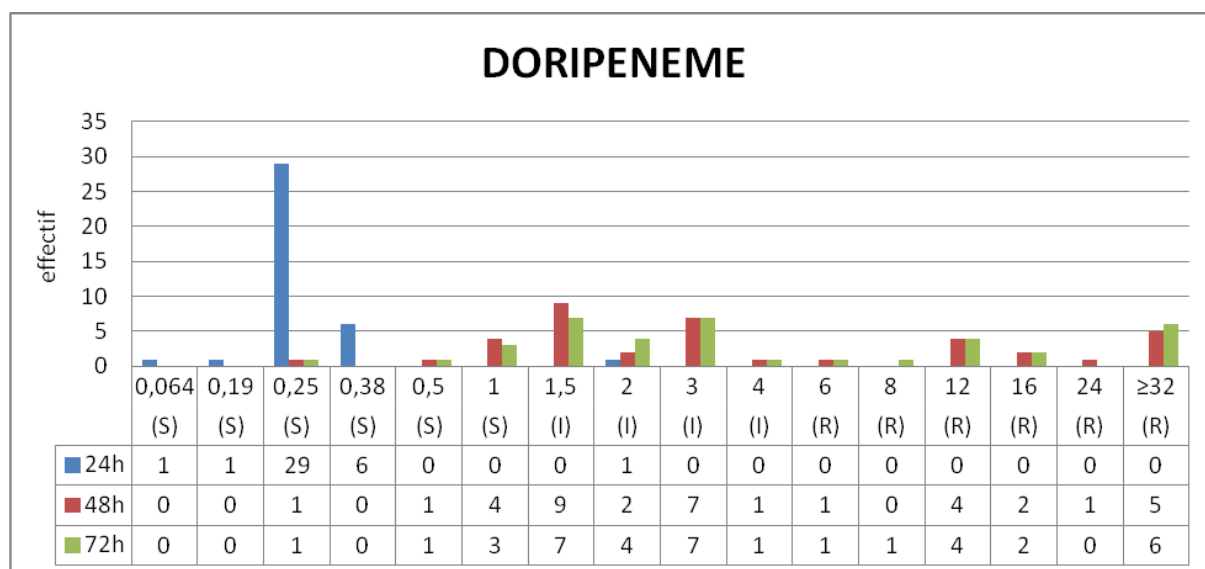


Figure 20 : Distribution des CMI (E-test®) de doripénème (en mg/L) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour le doripénème, 37 souches ont été catégorisées « S » à 24h et 1 « I » à 24h. A 48h, 6 souches ont été catégorisées « S » et 32 « I » ou « R ». Enfin à 72h, 33 souches ont été catégorisées « I » ou « R » et 5 toujours « S » (Figure 20).

Parmi les quatre carbapénèmes, l'imipénème, le méropénème et le doripénème sont les moins bons marqueurs de détection des carbapénémases de type OXA-48 avec la méthode des E-tests® ; en effet, pour l'imipénème, 19 souches sont encore catégorisées « S » à 72h, 6 encore pour le méropénème, et 5 encore pour le doripénème.

Par contre, pour l'ertapénème, avec cette méthode, seule 1 souche de *K. pneumoniae* non productrice de BLSE de type CTX-M15 (souche n°42 = CMI à 0,5 mg/L à 24h) est catégorisée « S » à 24h. Les 38 souches de *K. pneumoniae* sont catégorisées « R » dès 48h. Il est à noter qu'à 24h, 2 souches sont catégorisées « I » et donc déjà 35 « R ». L'ertapénème est donc, pour la méthode manuelle avec E-tests®, le meilleur marqueur parmi les quatre carbapénèmes pour la détection de souches de *K. pneumoniae* produisant une carbapénémase de type OXA-48.



Concernant l'incubation prolongée, un plus grand nombre de souches a été détecté après 24h d'incubation supplémentaire. Par exemple avec l'ertapénème, pour la seule souche (n°42) qui est catégorisée « S » à 24h, elle est catégorisée « R » à 48h ; cela confirme l'intérêt de faire une lecture à 48h. Il en est de même pour les 2 souches qui sont catégorisées « I » à 24h (n°39 = CMI à 0.75 mg/L à 24h et n°30 = CMI à 1 mg/L à 24h), elles sont catégorisées « R » à 48h. A 72h, les CMI de certaines souches de *K. pneumoniae* productrices d'une carbapénémase de type OXA-48 ont été encore plus élevées pour l'imipénème, le doripénème et le méropénème et ont permis de catégoriser « R » un plus grand nombre de souches. Par contre, concernant l'ertapénème, cette lecture n'a rien changé puisque toutes les souches de *K. pneumoniae* de l'étude ont déjà été catégorisées « R » à 48h.

Un possible phénomène d'hétérogénéité de résistance a été observé dans notre étude dans cette méthode manuelle de diffusion en gélose avec bandelettes E-tests<sup>®</sup> pour toutes les souches de *K. pneumoniae* de l'étude (sauf pour l'isolat de *K. pneumoniae* n°8 de pulsotype A). En effet, l'augmentation de la CMI de certaines souches était due, non pas à une diminution de l'ellipse d'inhibition en elle-même, mais à l'apparition de microcolonies à l'intérieur de la zone elliptique d'inhibition qui permettaient parfois de catégoriser la souche « R ». En effet, selon les recommandations du fabricant, il faut tenir compte de ces colonies pour déterminer la CMI des carbapénèmes avec les E-tests<sup>®</sup> pour les souches d'entérobactéries [E-test<sup>®</sup> reading guide]. Normalement, la CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et de la bandelette, mais si des microcolonies sont proches de la bandelette du carbapénème testé, elles doivent être prises en compte dans la lecture de la valeur de CMI pour la souche d'entérobactérie correspondante (Figure 21).

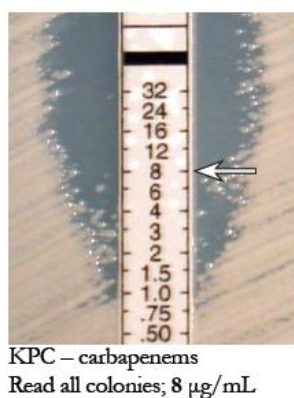


Figure 21 : Microcolonies proches de la bandelette à prendre en compte dans la détermination de la CMI d'un carbapénème pour une souche de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase de type KPC [E-test<sup>®</sup> reading guide].

Il est à souligner que ces microcolonies étaient déjà largement présentes dans les lectures à 24h des bandelettes E-tests<sup>®</sup> (Figure 22), mais un nombre de plus en plus important était observé à 48h et à 72h.

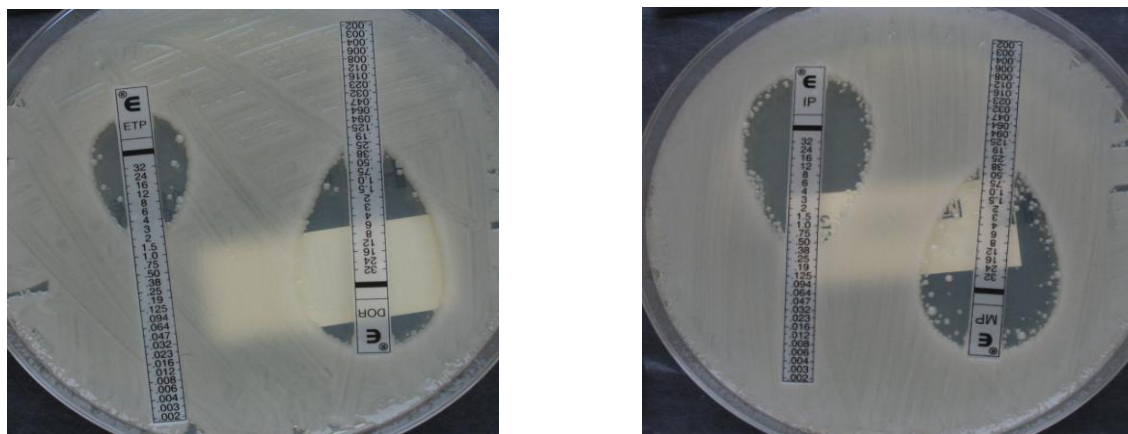


Figure 22 : Exemple d'une souche de *K. pneumoniae* sur géloses MH avec bandelettes E-test<sup>®</sup> des quatre carbapénèmes à 24h (ertapénème « ETP », doripénème « DOR » / imipénème « IP », méro pénème « MP »)

Contrairement à l'ertapénème où c'est plus souvent l'ellipse d'inhibition en elle-même qui est responsable d'une catégorisation « R » de la souche, pour les autres carbapénèmes, c'est fréquemment la présence des microcolonies proches de la bandelette qui permet la catégorisation « R ». Par exemple sur la photo ci-dessous, l'ertapénème permet la catégorisation de la souche « R » avec ou sans les microcolonies, alors que pour le doripénème, leur présence est importante car, sans elles, la souche serait catégorisée « S » (Figure 23).

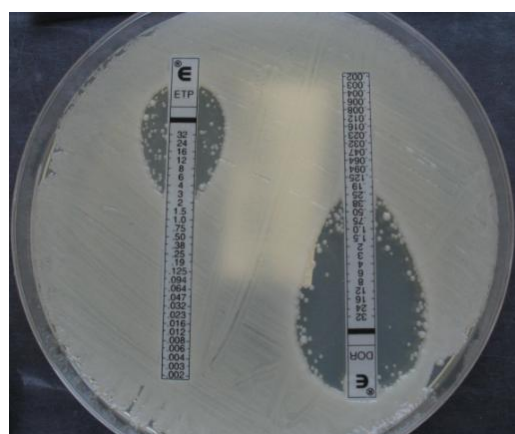


Figure 23 : Exemple de lectures de CMI à 24h pour une souche de *K. pneumoniae* de l'étude : la souche est catégorisée « R » pour les deux antibiotiques (ertapénème = CMI  $\geq$  32 mg/L et doripénème = CMI à 1,5 mg/L)

### III.3.1.2.2. Autres espèces d'entérobactéries OXA-48

N°	espèces	CMI (mg/L)											
		imipénème			méro pénème			ertapénème			doripénème		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
26	<i>E. coli</i>	0,25	1,5	1,5	0,19	1,5	1,5	0,75	6	6	0,125	0,75	0,75
37	<i>E. cloacae</i>	1,5	≥32	≥32	0,25	16	24	0,38	24	24	0,25	24	24
38	<i>K. oxytoca</i>	0,5	12	≥32	0,25	6	32	0,75	≥32	≥32	0,19	3	12
41	<i>E. aerogenes</i>	>32	>32	>32	>32	≥32	≥32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
43	<i>E. coli</i>	0,5	6	6	0,38	3	4	1	6	6	0,25	1	1

Tableau 12 : CMI (E-test<sup>®</sup>) des quatre carbapénèmes (en mg/L) des autres souches d'entérobactéries OXA-48 du travail (n=5 : 2 *E. coli*, 1 *E. cloacae*, 1 *K. oxytoca* et 1 *E. aerogenes*) et catégorisation des souches « S » (code couleur vert), « I » (code couleur violet) ou « R » (code couleur rouge)

Pour l'imipénème, pour les autres espèces d'entérobactéries, 4 souches ont été catégorisées « S » à 24h et seule la souche d'*E. aerogenes* a été catégorisée « R » à 24h. A 48h, la souche d'*E. coli* n°26 a été encore catégorisée « S » et celle d'*E. coli* n°43 « I ». Les souches de *K. oxytoca* et d'*E. cloacae* ont été catégorisées « R » à 48h. Il en était de même à 72h.

Pour le méropénème, 4 souches ont été catégorisées « S » à 24h et seule la souche d'*E. aerogenes* a été catégorisée « R » à 24h. A 48h, la souche d'*E. coli* n°26 a été encore catégorisée « S » et celle d'*E. coli* n°43 « I », tout comme la souche de *K. oxytoca*. Par contre, la souche d'*E. cloacae* a été catégorisée « R » à 48h. A 72h, la souche d'*E. coli* n°26 a été encore catégorisée « S » et celle d'*E. coli* n°43 encore « I ». La souche de *K. oxytoca* a été catégorisée « R » seulement à 72h.

Pour l'ertapénème, seule la souche d'*E. cloacae* a été catégorisée « S » à 24h. Les souches d'*E. coli* n°26 et de *K. oxytoca* ont été catégorisées « I » à 24h. Seules les souches d'*E. aerogenes* et d'*E. coli* n°43 ont été catégorisées « R » à 24h. A 48h, toutes les souches ont été catégorisées « R ».

Pour le doripénème, 4 souches ont été catégorisées « S » à 24h et seule la souche d'*E. aerogenes* a été catégorisée « R » à 24h. A 48h, les souches d'*E. coli* n°26 et n°43 ont été encore catégorisées « S » et celle de *K. oxytoca* « I ». Par contre, la souche d'*E. cloacae* a été catégorisée « R » à 48h. A 72h, les souches d'*E. coli* n°26 et n°43 sont restées catégorisées « S ». Seule la souche de *K. oxytoca* a été catégorisée « R » à 72h.

Pour les autres souches d'entérobactéries productrices d'OXA-48, c'est aussi l'ertapénème qui permet la détection d'un plus grand nombre d'isolats comme producteurs de carbapénémase de type OXA-48. En effet, pour cette molécule, les souches d'*E. aerogenes* et d'*E. coli* n°43 sont catégorisées « R » à 24h, les souches d'*E. coli* n°26 et de *K. oxytoca* sont catégorisées « I » et seule la souche d'*E. cloacae* est catégorisée « S » à 24h. La lecture à 48h permet de catégoriser toutes les souches « R » (Tableau 12).

Concernant la possible résistance hétérogène de ces souches, des microcolonies ont été observées pour la lecture des bandelettes E-tests<sup>®</sup> de toutes les autres espèces d'entérobactéries de l'étude. Néanmoins, certaines souches exprimaient plus ou moins cette éventuelle hétérogénéité de résistance et les colonies à l'intérieur de l'ellipse d'inhibition étaient mises en évidence avec certains carbapénèmes plus qu'avec d'autres ; l'ertapénème restant le carbapénème qui permettait d'en voir le plus.

### **III.3.1.3. Comparaison des diamètres d'inhibition obtenus par la méthode avec les disques**

Pour ce qui est de la deuxième méthode phénotypique manuelle de diffusion en gélose avec les disques, nous avons voulu encore une fois comparer les éventuelles variations pouvant exister par rapport aux autres méthodes phénotypiques, en termes de sensibilité aux carbapénèmes. Par exemple, nous avons voulu voir si la diffusion en gélose avec des disques était plus ou moins sensible, quant à la détection de la résistance aux carbapénèmes chez des souches OXA-48, par rapport à la diffusion avec les bandelettes E-tests<sup>®</sup> contenant un gradient de concentration d'antibiotique. De plus, nous avons voulu comparer les différentes lectures à 24h, et 48h afin de voir l'apport de cette lecture répétée après 24h d'incubation supplémentaire, quant aux interprétations de la sensibilité aux quatre carbapénèmes obtenues par cette méthode.

La lecture à 72h étant identique à celle à 48h pour toutes les souches de l'étude, elle n'est pas mentionnée dans le travail.

### III.3.1.3.1. Souches de *K. pneumoniae* OXA-48

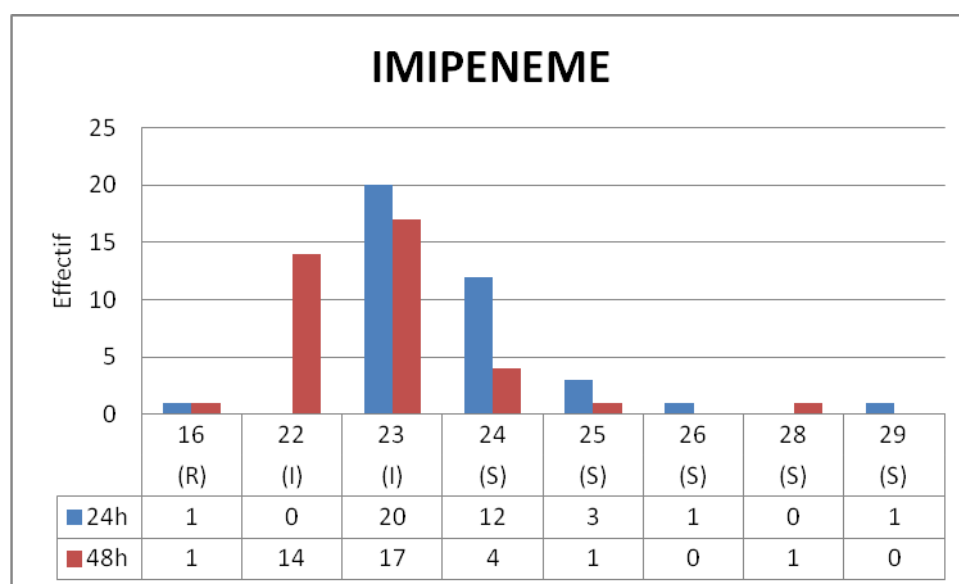


Figure 24 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoid®) de l'imipénème (en mm) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour l'imipénème, 17 souches ont été catégorisées « S » à 24h et 21 « I » ou « R » à 24h (1 seule « R »). A 48h, 32 souches ont été catégorisées « I » ou « R » (1 seule « R ») et 6 toujours « S » (Figure 24).

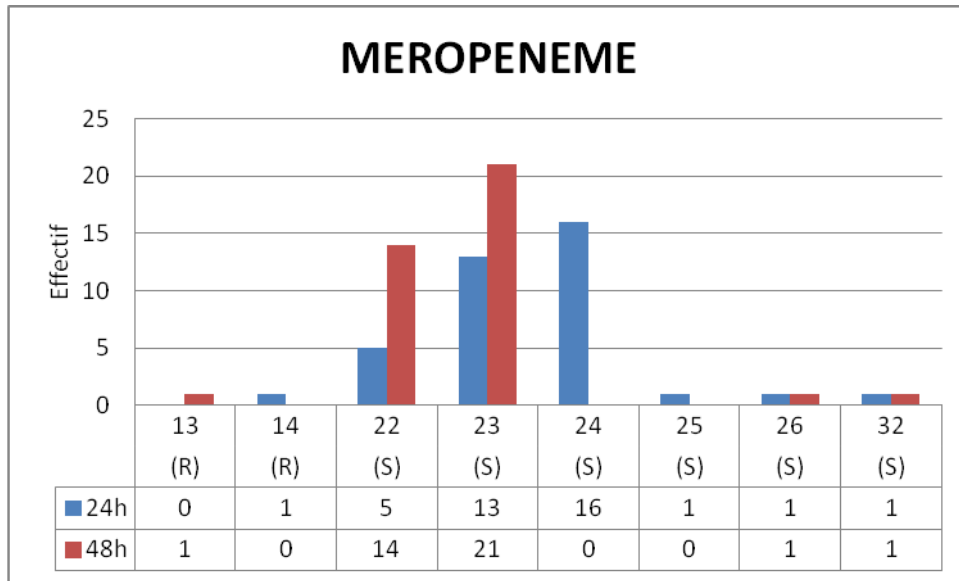


Figure 25 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoid®) du méropénème (en mm) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour le méropénème, 37 souches ont été catégorisées « S » à 24h et 1 seule « R » à 24h. Il en était de même à 48h (Figure 25).

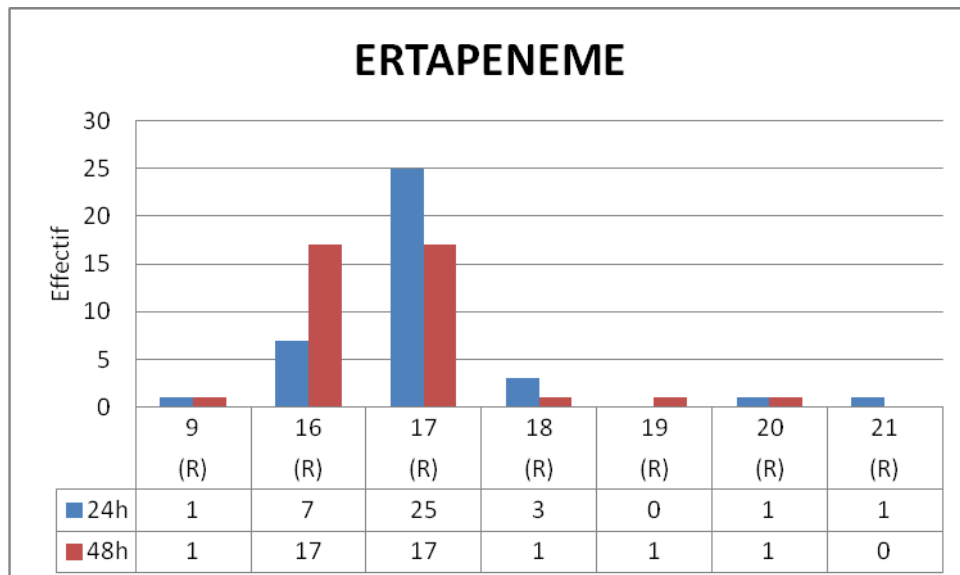


Figure 26 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoid®) de l'ertapénème (en mm) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour l'ertapénème, les 38 souches ont été catégorisées « R » dès 24h d'incubation (Figure 26).

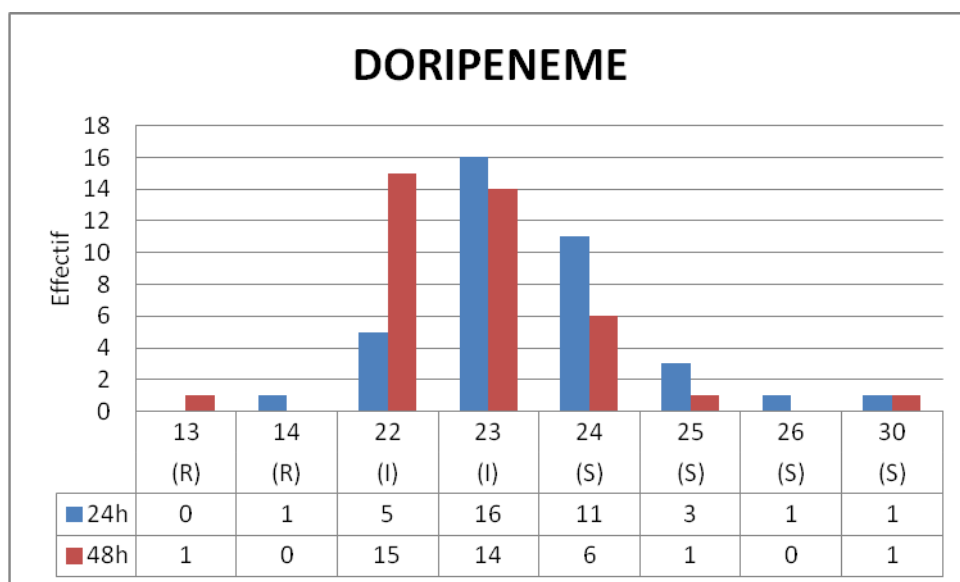


Figure 27 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoïd®) du doripénème (en mm) des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (n=38)

Par cette méthode, pour le doripénème, 16 souches ont été catégorisées « S » à 24h et 22 « I » ou « R » à 24h (1 seule « R »). A 48h, 30 souches ont été catégorisées « I » ou « R » (1 seule « R ») et 8 toujours « S » (Figure 27).

Parmi les quatre carbapénèmes, le méropénème est le moins bon marqueur de détection des carbapénémases de type OXA-48 pour cette méthode avec les disques. En effet, pour le méropénème, 37 souches sont catégorisées « S » et 1 seule « I » à 24h et à 48h. Pour l'imipénème, 17 souches sont catégorisées « S » à 24h et 21 « I » ou « R » (1 seule « R ») à 24h. A 48h, 6 souches sont encore catégorisées « S ». Pour le doripénème, 16 souches sont catégorisées « S » à 24h et 22 « I » ou « R » (1 seule « R ») à 24h. A 48h, 8 souches sont encore catégorisées « S ». Ces deux marqueurs ne permettent donc pas non plus une bonne détection des carbapénémases de type OXA-48, même si à 48h, ils ont permis de catégoriser

plus de souches « I » ou « R » que le méropénème. Par contre, pour l'ertapénème, les 38 souches sont catégorisées « R » dès la lecture à 24h. L'ertapénème est donc, pour la méthode manuelle avec les disques, le meilleur marqueur parmi les quatre carbapénèmes pour la détection des souches de *K. pneumoniae* produisant une carbapénémase de type OXA-48.

Concernant l'incubation prolongée, un plus grand nombre de microcolonies a été observé à 48h versus 24h. Par contre, la lecture répétée après 24h d'incubation supplémentaire a peu apporté finalement car le diamètre d'inhibition avait déjà permis de catégoriser les souches « R » dès 24h, du moins avec l'ertapénème ; pour les autres carbapénèmes, même à 48h, les résultats n'ont pas été probants.

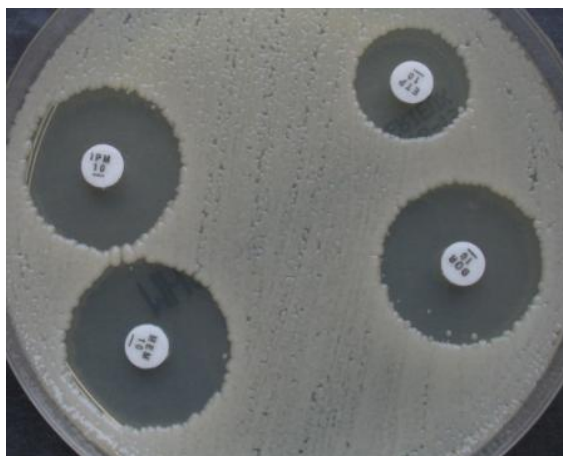


Figure 28 : Exemple d'une souche de *K. pneumoniae* sur gélose MH avec disques Oxoid® (10 µg) des quatre carbapénèmes à 24h (ertapénème « ETP », doripénème « DOR », imipénème « IPM », méropénème « ME »)

La technique avec les disques n'a pas permis l'observation d'autant de microcolonies que la méthode des E-tests® (Figure 28). En effet, la présence de microcolonies à l'intérieur des diamètres d'inhibition était moins fréquente avec les disques et très variable selon les souches de *K. pneumoniae*, même au sein de celles appartenant au pulsotype A. En tout cas, leur présence était d'autant plus fréquente que les souches étaient restées plus longtemps en incubation. Le fait que les disques ne permettent pas autant de voir cette possible hétérogénéité de résistance, par rapport à la méthode avec les E-tests®, est certainement en rapport avec le gradient de concentration contenu le long de la bandelette E-test®, contrairement au disque qui contient une concentration fixe de carbapénème.



### III.3.1.3.2. Autres espèces d'entérobactéries OXA-48

N°	espèces	Diamètres d'inhibition (en mm)							
		imipénème		méro pénème		ertapénème		doripénème	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
26	<i>E. coli</i>	23	22	25	24	21	20	25	24
37	<i>E. cloacae</i>	21	20	22	21	17	16	21	21
38	<i>K. oxytoca</i>	24	23	25	25	21	21	25	24
41	<i>E.aerogenes</i>	6	6	8	7	6	6	10	9
43	<i>E. coli</i>	23	21	24	23	18	18	23	22

Tableau 13 : Diamètres d'inhibition (disques Oxoid®) des quatre carbapénèmes (en mm) des autres souches d'entérobactéries OXA-48 du travail (n=5 : 2 *E. coli*, 1 *E. cloacae*, 1 *K. oxytoca* et 1 *E. aerogenes*) et catégorisation des souches « S » (code couleur vert), « I » (code couleur violet) ou « R » (code couleur rouge)

Pour l'imipénème, pour les autres espèces d'entérobactéries, la souche de *K. oxytoca* a été catégorisée « S » à 24h et 3 souches « I » à 24h ; seule la souche d'*E. aerogenes* a été catégorisée « R » à 24h. Il en était de même à 48h, sauf pour la souche de *K. oxytoca* qui a été catégorisée « I » à 48h.

Pour le méropénème, 4 souches ont été catégorisées « S » à 24h et seule la souche d'*E. aerogenes* a été catégorisée « R » à 24h. Il en était de même à 48h, sauf pour la souche d'*E. cloacae* qui a été catégorisée « I » à 48h.

Pour l'ertapénème, toutes les souches ont été catégorisées « R » à 24h.

Pour le doripénème, seule la souche d'*E. aerogenes* a été catégorisée « R » à 24h. Les souches d'*E. coli* n°26 et de *K. oxytoca* ont été catégorisées « S » à 24h et celles d'*E. cloacae* et d'*E. coli* n°43 « I » à 24h. Il en était de même à 48h.

Pour les autres souches d'entérobactéries productrices d'OXA-48, c'est aussi l'ertapénème qui permet la détection d'un plus grand nombre d'isolats comme producteurs de carbapénémase de type OXA-48. En effet, pour cette molécule, toutes les souches sont catégorisées « R » dès 24h. Il est à noter que c'est même la seule molécule qui permet de catégoriser « R » les autres souches d'entérobactéries de l'étude à part la souche d'*E. aerogenes* (Tableau 13).

Concernant la possible résistance hétérogène de ces souches, des microcolonies à l'intérieur des diamètres d'inhibition ont été observées seulement pour les isolats de *K. oxytoca* n°38 et d'*E. coli* n°43.

#### **III.3.1.4. Synthèse**

Cette étude nous a permis tout d'abord d'évaluer la méthode semi-automatisée disponible au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy en termes de détection de carbapénémase de type OXA-48 ; elle nous a aussi permis de comparer cette méthode avec certaines méthodes manuelles afin d'évaluer leurs diverses performances. De plus, elle nous a aidé à juger de l'apport des méthodes manuelles par rapport aux méthodes automatisées et de voir quelle méthode nous paraissait la plus intéressante, voire même quelles méthodes associées nous permettaient de suspecter au mieux la présence d'une carbapénémase de type OXA-48.

On vient de voir que l'ertapénème s'était avéré être le meilleur marqueur de détection des souches productrices de carbapénémase de type OXA-48, que ce soit par la méthode semi-automatisée ou par les deux méthodes manuelles utilisées.

Pour les autres souches d'entérobactéries OXA-48, les résultats des CMI obtenues par le système Vitek2<sup>®</sup> pour l'ertapénème sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 14) :

espèces		ertapénème	
		étude	routine
<i>E. coli</i>	n°26	4	1
	n°43	4	≥8
<i>E. cloacae</i>		4	12
<i>K. oxytoca</i>		4	4
<i>E. aerogenes</i>		4	≥8

Tableau 14 : CMI (Vitek2®) d'ertapénème (en mg/L) des autres souches d'entérobactéries OXA-48 du travail (n=5 : 2 *E. coli*, 1 *E. cloacae*, 1 *K. oxytoca* et 1 *E. aerogenes*) et catégorisation des souches « R » (code couleur rouge)

Sur la base de ces données brutes, pour les autres entérobactéries, toutes les souches ont été catégorisées « R » dans notre étude et en routine pour l'ertapénème par le système Vitek2®.

Si on fait la synthèse des différentes méthodes phénotypiques, on peut compter le nombre de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase de type OXA-48 détectées grâce à l'ertapénème (Tableau 15), d'après les critères du CASFM 2012, pour chacune des méthodes phénotypiques détaillées auparavant (travail expérimental et routine).

Espèces			Système Vitek2®			E-tests®			Disques Oxoid®	
			Etude	Routine		24h	48h	72h	24h	48h
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M15 +	(n=29)	29	28	(n=36)	36			36	
	CTX-M15 - (KP30/KP42)	(n=2)	2	2	(n=2)	1	2		2	
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> 26	(n=1)	1	1		1			1	
	<i>E. coli</i> 43	(n=1)	1	1		1			1	
<i>E. cloacae</i>		(n=1)	1	1		0	1		1	
<i>K. oxytoca</i>		(n=1)	1	1		1			1	
<i>E. aerogenes</i>		(n=1)	1	1		1			1	

Tableau 15 : Nombre de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase de type OXA-48 détectées grâce à l'ertapénème pour chaque méthode phénotypique [CASFM 2012]

Remarque : Les souches de *K. pneumoniae* manquantes en routine dans la méthode avec le système Vitek2<sup>®</sup> sont les isolats de *K. pneumoniae* producteurs de BLSE de type CTX-M15 n°12, n°19, n°24, n°27, n°29, n°35 et n°36.

Seule 1 souche de *K. pneumoniae* produisant une BLSE de type CTX-M15 associée à l'OXA-48 n'est pas détectée par le système Vitek2<sup>®</sup> en routine (CMI  $\leq$  0,5 mg/L). Avec la méthode des E-tests<sup>®</sup>, seule 1 souche de *K. pneumoniae* ne produisant pas de BLSE de type CTX-M15 associée à l'OXA-48 (CMI = 0,5 mg/L à 24h) et la souche d *E. cloacae* productrice d'OXA-48 et de BLSE CTX-M15 (CMI = 0,38 mg/L à 24h) ne sont pas détectées à la lecture à 24h, mais elles sont catégorisées « R » dès 48h.

Cette synthèse des différentes méthodes phénotypiques à l'aide de l'ertapénème nous permet de conclure d'une part que l'ertapénème s'avère être un très bon marqueur de détection de toutes les espèces d'entérobactéries productrices de carbapénémase de type OXA-48 de notre étude. D'autre part, la méthode des disques avec une lecture après 24h d'incubation est la plus sensible ; en effet, l'ertapénème permet de catégoriser toutes les souches d'entérobactéries de l'étude « R » dès 24h.

**Remarque : Interprétation selon EUCAST / CASFM 2012 versus CLSI**

Le marqueur de détection choisi pour la catégorisation des souches potentiellement productrices de carbapénémase de type OXA-48 étant l'ertapénème, la catégorisation des souches est la même si on se base sur les critères du CLSI 2012 versus EUCAST / CASFM 2012 puisque les CMI obtenues à 24h pour l'ertapénème sont toutes  $\geq 0,5$  mg/L. La seule souche catégorisée « S » à 24h l'aurait aussi été avec les critères du CLSI 2012 ; néanmoins elle aurait pu être catégorisée « I » avec les critères du CLSI 2010, car elle avait une CMI à 0,5 mg/L (Tableau 16).

CARBAPENEME	EUCAST		CLSI		EUCAST		CLSI ( <i>vs 2010</i> )	
	Diamètres d'inhibition (mm)				CMI (mg/L)			
	S	R	S	R	S	R	S	R
imipénème	$\geq 22$	$< 16$	$\geq 23$	$\leq 19$	$\leq 2$	$> 8$	$\leq 1$	$\geq 4$
méropénème	$\geq 22$	$< 16$	$\geq 23$	$\leq 19$	$\leq 2$	$> 8$	$\leq 1$	$\geq 4$
ertapénème	$\geq 25$	$< 22$	$\geq 22$	$\leq 18$	$\leq 0,5$	$> 1$	$\leq 0,5$ ( <i>vs <math>\leq 0,25</math></i> )	$\geq 2$ ( <i>vs <math>\geq 1</math></i> )
doripénème	$\geq 24$	$< 18$			$\leq 1$	$> 4$		
	CASFM				CASFM			
	S	R			S	R		
imipénème	$\geq 24$	$< 17$			$\leq 2$	$> 8$		
méropénème	$\geq 22$	$< 15$			$\leq 2$	$> 8$		
ertapénème	$\geq 28$	$< 26$			$\leq 0,5$	$> 1$		
doripénème	$\geq 24$	$< 19$			$\leq 1$	$> 4$		

Tableau 16 : Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (en mm) et des CMI (en mg/L) pour les carbapénèmes en fonction des critères EUCAST / CLSI 2012 (versus CLSI 2010) et CASFM 2012 [CASFM 2012, CLSI 2010, CLSI 2012, EUCAST 2012]

### III.3.2. Résistances associées

L'étude de la sensibilité aux autres antibiotiques a été réalisée à l'aide du système Vitek2<sup>®</sup> (logiciel 04.02) complétée pour certaines molécules (colistine, tigécycline) et pour certaines souches d'entérobactéries OXA-48 de CMI obtenues par la méthode des E-tests<sup>®</sup>.

L'ensemble des résultats obtenus à l'aide du système Vitek2<sup>®</sup> (logiciel 04.02) est présenté dans le tableau suivant (Tableau 17).

Espèces	CTX	CAZ	G	T	N	A	CIP	FT	SXT	pulsotype	CTX-M15	
<i>K. pneumoniae</i>	KP 1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11/ 12/13/14/15/16/17/18/ 19/20/21/22/23/24/27/ 28/29/31/32/33/34/35/ 36/40	R	R	R	R	R	S	R	R	R	A sauf 27/28/34/ 35/36/40 ND	+
	KP 25	R	R	S	R	R	I*	R	R	R	A	+
	KP 42	S	S	S	R	I*	I*	R	S	R	ND	-
	KP 39	R	R	S	S	S	S	R	S	R	ND	+
	KP 30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	-
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> 26	S	S	R	R	R	S	S	S	R	B	-
	<i>E. coli</i> 43	R	S	R	R	R	S	S	S	R	ND	-
<i>E. cloacae</i>		I	I*	S	S	S	S	S	S	S	ND	-
<i>K. oxytoca</i>		S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	-
<i>E. aerogenes</i>		R	R*	S	S	S	S	R	R	S	ND	-

Tableau 17 : Différents profils de résistance observés pour les différentes souches d'entérobactéries OXA-48 de l'étude en fonction de différentes molécules d'antibiotiques : céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), gentamicine (G), tobramycine (T), nétilmicine (N), amikacine (A), ciprofloxacine (CIP), nitrofurantoïne (FT), sulfaméthoxazole-triméthoprime (SXT), du pulsotype et de la présence ou non de la BLSE CTX-M15 associée à la carbapénémase de type OXA-48

Remarque : L'astérisque « \* » signifie que les résultats bruts ont été interprétés en fonction du phénotype de résistance probable (lecture interprétative de l'antibiogramme) [CASFM 2012].

Pour le groupe principal des souches de *K. pneumoniae*, les CMI obtenues par la méthode des E-tests<sup>®</sup> pour la colistine (quand elle a été réalisée) ont permis de catégoriser toutes les souches « S ». Il en est de même pour les souches de *K. pneumoniae* n°42, n°39 et n°30 (à l'exception de la souche n°25, non réalisée). Pour les autres espèces d'entérobactéries, toutes les souches ont également été catégorisées « S » pour la colistine.

En ce qui concerne la tigécycline, pour le groupe principal des souches de *K. pneumoniae*, les CMI obtenues par la méthode des E-tests® ont permis de catégoriser les souches « S », « I » ou « R ». Pour les souches de *K. pneumoniae* n°42 et n°39, elles ont pu être catégorisées « S », alors que la souche n°30 a été catégorisée « I » (souche n°25, non réalisée). Pour les autres espèces d'entérobactéries, toutes les souches ont été catégorisées « S » pour la tigécycline.

Parmi les souches de *K. pneumoniae*, on observe que les isolats appartenant au clone de pulsotype A (sauf *K. pneumoniae* n°25) étaient résistantes au céfotaxime, à la ceftazidime, à la ciprofloxacine, au sulfaméthoxazole-triméthoprimine et à la gentamicine, tobramicine, nétilmicine (phénotype de résistance aux aminosides « GTN » évoquant la production par ces souches de l'enzyme AAC(3)-II de haut niveau) et sensibles à l'amikacine et à la colistine.

A l'inverse, la souche de *K. pneumoniae* n°30 appartenant au clone de pulsotype C et ne produisant pas de BLSE de type CTX-M15 était sensible à l'ensemble de ces molécules incluant le céfotaxime et la ceftazidime, mais catégorisée « I » pour la tigécycline.

Pour les souches de pulsotype A, elles produisaient toutes une carbapénémase de type OXA-48 et une BLSE CTX-M15. On peut remarquer que même si elles appartenaient toutes au même clone, ces souches n'étaient quand même pas toutes identiques ; en effet, la souche de *K. pneumoniae* n°25 différait des autres souches de *K. pneumoniae* de par son profil de résistance aux aminosides : elle restait sensible à la gentamicine, mais était résistante à la tobramicine, à la nétilmicine et à l'amikacine (phénotype de résistance aux aminosides « TNA » évoquant la production par cette souche de l'enzyme AAC(6')1 de bas niveau).

La souche de *K. pneumoniae* n°42 ne produisant pas de BLSE CTX-M15 était sensible au céfotaxime, à la ceftazidime, à la nitrofurantoïne et résistante à la ciprofloxacine, au sulfaméthoxazole-triméthoprimine. Pour les aminosides, elle présentait un phénotype « TNA » comme la souche n°25. De plus, elle était sensible à la colistine et à la tigécycline.

La souche de *K. pneumoniae* n°39 produisant une BLSE CTX-M15 était sensible aux aminosides et à la nitrofurantoïne, mais résistante au céfotaxime, à la ceftazidime, à la ciprofloxacine et au sulfaméthoxazole-triméthoprimine.

La souche d'*E. coli* n°26 appartenant au pulsotype B et ne produisant pas de BLSE CTX-M15 était sensible au céfotaxime, à la ceftazidime, à la ciprofloxacine et à la nitrofurantoïne, mais résistante au sulfaméthoxazole-triméthoprim, à la gentamicine, à la tobramicine, à la nétilmicine évoquant un phénotype de résistance aux aminosides de type « GTN », comme les souches de *K. pneumoniae* de pulsotype A.

La souche d'*E. coli* n°43 produisant une BLSE CTX-M9 du groupe 9 était sensible à la ceftazidime, à la ciprofloxacine, à la nitrofurantoïne, à la colistine, à la tigécycline, présentait un phénotype de résistance de type « GTN » aux aminosides et était résistante au céfotaxime et au sulfaméthoxazole-triméthoprim. Pour ce qui est du phénotype de résistance particulier aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, céfotaxime et ceftazidime, de cette souche par rapport aux autres souches de l'étude produisant une BLSE de type CTX-M15 (groupe 1 des CTX-M), cela s'explique par la différence d'hydrolyse des différents groupes de CTX-M. Les BLSE de type CTX-M ou « céfotaximases », comme nous l'avons développé précédemment (voir II.2.2.2.1), sont appelées ainsi car elles ont la propriété d'hydrolyser plus fortement le céfotaxime que la ceftazidime, contrairement à leurs prédécesseurs (TEM, SHV). Concernant les enzymes du groupe 9 des CTX-M, elles n'hydrolysent généralement pas du tout la ceftazidime [Bonnet 2004], contrairement à celles du groupe 1, comme par exemple la CTX-M15 produite par certaines souches de notre étude.

La souche d'*E. cloacae* ne produisait pas de BLSE CTX-M15 et était sensible à l'ensemble des molécules testées, sauf au céfotaxime et à la ceftazidime pour lesquelles elle était de sensibilité intermédiaire (céphalosporinase hyperproduite).

La souche de *K. oxytoca* ne produisait pas de BLSE CTX-M15 et était sensible à l'ensemble des molécules d'antibiotiques testées.

La souche d'*E. aerogenes* ne produisait pas de BLSE CTX-M15 et était sensible aux aminosides, au sulfaméthoxazole-triméthoprim, à la colistine, à la tigécycline et résistante au céfotaxime et à la ceftazidime (céphalosporinase hyperproduite), à la ciprofloxacine et à la nitrofurantoïne.



## **IV – Discussion**

### **IV.1. Travail expérimental**

#### **IV.1.1. Méthode semi-automatisée (Vitek2<sup>®</sup>, logiciel 04.02)**

Selon les données de la littérature, l'ertapénème est le carbapénème le plus sensible pour la détection des souches productrices de carbapénémases [Annexe 1 du CASFM 2012, McGettigan *et al.* 2009, Mocquet *et al.* 2011, Vading *et al.* 2010]. Il est intéressant de voir si la méthode semi-automatisée de l'étude confirme ces données. La production d'une carbapénémase doit être suspectée lorsque la CMI de l'ertapénème est  $> 0,5$  mg/L [CASFM 2012]. Dans notre étude, grâce à l'interprétation des résultats selon cette concentration critique du CASFM, l'ertapénème a permis de catégoriser « R » toutes les souches d'entérobactéries étudiées produisant une carbapénémase de type OXA-48. Notre étude confirme bien que l'ertapénème est un marqueur sensible pour la détection des carbapénémases.

On a pu comparer ce carbapénème avec l'autre carbapénème contenu dans le panel des antibiotiques de la carte AST-N103 utilisée, à savoir l'imipénème. L'imipénème s'est avéré être un mauvais marqueur pour la détection des carbapénémases de type OXA-48. En effet, les valeurs de CMI sont globalement plus dispersées et même dans les conditions précitées de notre étude (même jour, même opérateur), le nombre de souches non détectées reste important. A l'inverse, l'ertapénème permet une catégorisation « R » dans tous les cas, associée à une moindre dispersion des valeurs de CMI obtenues. Notre étude indique que l'ertapénème est le meilleur marqueur pour la détection des entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 par rapport à l'imipénème par le système Vitek2<sup>®</sup> avec la carte AST-N103 sur la version 04.02 utilisée. Cette meilleure sensibilité de l'ertapénème, versus imipénème, sur ce système Vitek2<sup>®</sup> est retrouvée dans la littérature avec la même carte AST-N103 et la même version de logiciel [Cuzon *et al.* 2011] et avec d'autres cartes AST [Vading *et al.* 2010].

Cependant, dans la littérature, le système Vitek2<sup>®</sup> n'est pas le plus sensible des systèmes en ce qui concerne la détection des enzymes de type OXA-48 (Tableau 18) par rapport à d'autres systèmes automatisés comme Phoenix<sup>®</sup> (BD Diagnostics) ou Microscan<sup>®</sup> (Siemens) [Woodford *et al.* 2010].

Carbapénémase	Nombre d'isolats détectés par le système							
	Phoenix <sup>®</sup>		Microscan NM36 <sup>®</sup>		Microscan NBC39 <sup>®</sup>		Vitek2 <sup>®</sup>	
	+	-	+	-	+	-	+	-
KPC (n = 8)	8	0	8	0	8	0	8	0
MBL (incluant NDM-1) (n = 20)	20	0	19	1	20	0	16	4
OXA-48 (n = 11)	11	0	6	5	4	7	5	6

Tableau 18 : Détection de différents types de carbapénémases par différents systèmes automatisés [d'après Woodford *et al.* 2010]

Certains biais sont néanmoins à prendre en compte dans notre étude. En effet, les souches étudiées dans notre travail expérimental provenaient d'un clone prédominant (pulsotype A) et les 43 souches produisaient la carbapénémase OXA-48 ; peut-être qu'en testant d'autres carbapénémases de la classe D d'Amblar et un plus grand nombre de souches, les résultats auraient été moins bons. De plus, concernant la reproductibilité de telles méthodes, notre étude a été faite un même jour et non sur une longue période comme c'est le cas dans les résultats de routine ; et par un même opérateur, alors que différents techniciens opèrent au quotidien dans un laboratoire de bactériologie.

Il est à noter que pour pouvoir comparer au mieux les méthodes « étude versus routine », on aurait pu faire la dispersion à l'aide de « deltas » pour le système Vitek2<sup>®</sup>. Cela n'a pas été possible en raison des valeurs obtenues grâce au système : des valeurs de CMI  $\leq$  à 1 mg/L ne nous indiquent pas une valeur précise et aucune comparaison entre les CMI ne peut être faite (des CMI « vraies » rendues par d'autres techniques nous l'auraient permis). Il en est de même pour comparer la méthode automatisée avec la méthode manuelle des E-tests<sup>®</sup> ; aucun groupe ne peut être fait en raison des résultats obtenus avec le Vitek2<sup>®</sup>.

#### **IV.1.2. Méthodes manuelles de diffusion en gélose avec les bandelettes E-test® et avec les disques**

Par les deux méthodes manuelles de diffusion en gélose avec les E-tests® et les disques, l'ertapénème s'avère aussi être un très bon marqueur de détection des souches productrices de carbapénémase de type OXA-48 de notre étude. En effet, en se basant sur la concentration critique et le diamètre critique selon le CASFM 2012, on doit suspecter la production d'une carbapénémase lorsque la CMI de l'ertapénème est  $> 0,5$  mg/L ou lorsque le diamètre d'inhibition autour du disque d'ertapénème est  $< 28$  mm, ce qui est le cas pour tous nos isolats après 48h d'incubation pour les E-tests® et dès 24h pour les disques. Notre étude confirme bien que l'ertapénème est un marqueur sensible pour la détection de ce type d'enzyme et que parmi les quatre carbapénèmes, c'est le meilleur marqueur de détection de telles souches. Certaines études obtiennent des résultats similaires : sur 11 souches d'entérobactéries productrices d'OXA-48, détectées au Sénégal, et testées par la méthode des E-tests®, 9 sont catégorisées « I » ou « R » avec l'ertapénème et « S » avec l'imipénème ou le méropénème [Mocquet *et al.* 2011]. Le CASFM indique que la lecture des CMI (ou des diamètres) doit être faite après 18 à 24h d'incubation pour les entérobactéries [CASFM 2012]. Hors, on remarque, au vu des résultats du travail expérimental, qu'une lecture répétée à 48h pourrait être suggérée pour la méthode des E-tests®. En effet, certaines souches d'entérobactéries ne sont catégorisées « R » qu'à la deuxième lecture des CMI d'ertapénème après 24h d'incubation supplémentaire. Ce n'est pas le cas pour la méthode des disques où la lecture à 24h des diamètres d'inhibition d'ertapénème suffit pour la catégorisation « R » de toutes les souches de l'étude.

Concernant les autres carbapénèmes, l'incubation prolongée s'est avérée être intéressante pour la méthode avec E-tests®. Dans la littérature, peu de données existent concernant une relecture à 48h ou même à 72h. Dans notre étude, sans cette lecture répétée, l'imipénème n'aurait permis de catégoriser qu'une souche de *K. pneumoniae* « I » à 24h, alors que 14 ont pu être catégorisées « I » ou « R » à 48h ; le méropénème n'aurait pas permis de catégoriser de souches « I » ou « R » à 24h, alors que 31 ont été catégorisées de la sorte à 48h ; le doripénème n'aurait permis d'en catégoriser qu'une « I » à 24h, alors que 32 ont pu être catégorisées « I » ou « R » à 48h. A 72h, le nombre de souches pouvant être catégorisées

« I » ou « R » a encore augmenté pour l'imipénème, le méropénème et le doripénème avec respectivement 19, 32 et 33 souches « I » ou « R » pour chacune des molécules. Pour l'ertapénème par contre, 1 seule souche de *K. pneumoniae* a été catégorisée « S » à 24h et les 38 souches de *K. pneumoniae* ont été catégorisées « R » à 48h. Il en est de même pour les autres espèces d'entérobactéries, puisque l'ertapénème permet de catégoriser toutes les souches « R » à 24h sauf 1 souche qui ne peut être catégorisée « R » qu'à 48h. Les résultats sont également très variables selon les carbapénèmes utilisés ; cependant, les souches catégorisées « S » à 48h le sont encore à 72h : cette incubation supplémentaire a été inutile pour ces souches.

Les augmentations des CMI après l'incubation prolongée peuvent être en rapport avec une expression plus tardive de la résistance aux carbapénèmes et cela surtout avec l'imipénème, le méropénème et le doripénème. En effet, l'ellipse d'inhibition observée à 48h, et même à 72h, était, pour certaines souches, de plus en plus petite. Cela est d'autant plus marqué pour les trois marqueurs cités précédemment, et même si la lecture à 72h apportait peu pour l'ertapénème, quant à la catégorisation des souches, elle a permis d'observer des CMI encore plus élevées. Les augmentations des CMI peuvent aussi être en rapport avec une éventuelle hétérogénéité de résistance. Notre étude indique en tout cas que la lecture à 48h de la CMI de l'ertapénème sur bandelette E-test<sup>®</sup> est la meilleure façon de suspecter toutes les souches d'entérobactéries comme productrices de carbapénémase de type OXA-48.

Concernant la méthode des disques pour les autres carbapénèmes que l'ertapénème, l'incubation prolongée s'avère peu intéressante. En effet, même si on observe une diminution des diamètres d'inhibition pour la lecture à 48h versus celle à 24h, elle ne permet quand même pas de catégoriser toutes les souches « I » ou « R » pour les marqueurs imipénème, méropénème et doripénème. A noter que pour le méropénème, cette lecture à 48h ne change même rien quant à la catégorisation « R » des souches de *K. pneumoniae*. Seule la catégorisation de la souche d'*E. cloacae* de « S » à « I » pour le méropénème est modifiée à la lecture à 48h parmi toutes les entérobactéries de l'étude. Par contre, pour l'ertapénème, toutes les souches ont pu être catégorisées « R » à 24h. Cela confirme les données du CASFM, à savoir qu'une incubation de 24h est suffisante pour lire les diamètres d'inhibition et interpréter la sensibilité des souches en fonction de ces résultats. Néanmoins, pour la méthode des E-tests<sup>®</sup>, une nouvelle souche a pu être détectée à 48h. Cette incubation supplémentaire

serait peut-être intéressante pour cette technique, surtout que la possible hétérogénéité de résistance était encore plus marquée à 48h. Cependant, de nombreuses études rapportent le problème des bandelettes E-tests<sup>®</sup> pour la détermination des CMI d'entérobactéries pour les carbapénèmes [Ruppé *et al.* 2012, Stuart *et al.* 2010] à cause des microcolonies apparaissant dans l'ellipse d'inhibition et rendant la lecture de la CMI difficile.

L'hétérogénéité de résistance est un phénomène observé pour une grande variété d'espèces bactériennes [Falagas *et al.* 2011]. Concernant la résistance aux carbapénèmes, ce phénomène a été rapporté chez diverses espèces de bacilles Gram négatif, notamment pour des souches d'*A. baumannii* [Superti *et al.* 2009], de *P. aeruginosa* [Pournaras *et al.* 2007], de *K. pneumoniae* [Cuzon *et al.* 2010, Tato *et al.* 2010], d'*Enterobacter spp.* [Gordon *et al.* 2009]... Il a été suggéré que les méthodes automatisées en milieu liquide détectaient parfois mal les isolats exprimant ce type de résistance [Gordon *et al.* 2009, Tenover *et al.* 2006]. Ce phénomène de résistance hétérogène pourrait être une des causes de la difficulté de détection des souches produisant une carbapénémase de type OXA-48. Par ailleurs, en milieu solide, la mise en évidence de cette hétérogénéité de résistance peut nécessiter une incubation prolongée afin d'être observée. Ceci a d'ailleurs été constaté dans notre étude, mais aucune recommandation n'est à ce jour mise en œuvre concernant la lecture des entérobactéries à plus de 24h d'incubation, à l'instar de ce qui est utilisé pour la détection de la résistance hétérogène de souches de *Staphylococcus aureus* à l'oxacilline [CASFM 2012, Owona *et al.* 2002] ou de la lecture des CMI ou diamètres d'inhibition de souches de bactéries anaérobies [CASFM 2012]. En effet, dans ces deux exemples, le CASFM conseille, d'une part, de prolonger éventuellement l'incubation des isolats de *Staphylococcus aureus* si la croissance est faible à 24h, et d'autre part, de faire la lecture après 48h d'incubation en anaérobiose pour les bactéries anaérobies [CASFM 2012]. Il était intéressant de voir ce qu'il en était avec les entérobactéries et les carbapénèmes. Dans l'objectif de mettre en évidence un possible mécanisme de résistance hétérogène, les lectures des diamètres d'inhibition sur disques et CMI sur E-tests<sup>®</sup> ont été répétées pour toutes les souches du travail expérimental à 48h et 72h, en plus des 24h réglementaires. Pour prouver qu'il s'agissait bien d'un tel phénomène dans notre travail expérimental, des études complémentaires, comme par exemple une étude de population, auraient été néanmoins nécessaires.

Ce mécanisme de résistance hétérogène est difficile à mettre en évidence et il n'existe actuellement pas de technique disponible en routine pour analyser de telles souches. De plus, aucun consensus sur les modalités phénotypiques de détection n'est disponible concernant la composition des milieux à utiliser, la taille de l'inoculum, la durée d'incubation...

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la présence de microcolonies. Cela peut être dû tout d'abord à une population hétérogène, c'est-à-dire à une petite partie de la population d'une souche qui peut exprimer une résistance plus grande que la majorité des autres colonies de la population ; cela quand les microcolonies sont déjà présentes à 24h. Dans ce cas, les microcolonies qui apparaissent correspondent à une sous-population de quelques colonies plus résistantes que d'autres au sein de la même souche ; cela pouvant être la conséquence de différents mécanismes qui se surajoutent à la carbapénémase. Cette hétérogénéité de résistance pourrait peut-être expliquer les variations observées dans notre étude et chez différents isolats d'un même clone. Aussi l'apparition de microcolonies peut être due à une partie de la population exprimant faiblement sa carbapénémase ; cela quand les microcolonies n'apparaissent qu'après une incubation supplémentaire. On ne peut néanmoins pas exclure qu'à 48h et à 72h, il peut s'agir de colonies n'ayant pas été tuées. Du fait d'une diminution des concentrations actives des carbapénèmes dans le milieu gélosé, des survivants peuvent apparaître, conséquence d'une croissance secondaire. La cause de l'apparition de microcolonies à plus de 24h d'incubation peut aussi être le fait d'une résistance qui met plus longtemps à apparaître, comme une hyperexpression d'efflux par exemple ou encore la mutation de porines.

Cependant, en plus d'un effet lié à la résistance, on sait aussi que l'apparition de micro- ou macro- colonies peut être liée à la molécule d'antibiotique utilisée si celle-ci est bactéricide ; ce qui est le cas des carbapénèmes [Wolff *et al.* 2009]. Dans ce cas, on est en présence d'une population homogène, mais l'antibiotique peut ne pas être bactéricide sur toute la population bactérienne.

### IV.1.3. Synthèse

Les différentes méthodes utilisées dans notre étude, à savoir la méthode semi-automatisée (système Vitek2<sup>®</sup>, bioMérieux, logiciel 04.02, carte AST-N103) et les deux méthodes manuelles (méthode de diffusion sur géloses avec E-tests<sup>®</sup> et disques) nous ont toutes les trois permis de conclure que pour les quatre carbapénèmes, c'est l'ertapénème qui s'avère être le meilleur marqueur de détection des carbapénémases de type OXA-48 pour toutes les souches d'entérobactéries de l'étude.

Avec l'ertapénème comme marqueur de détection des carbapénémases de type OXA-48, on peut suspecter une souche d'entérobactérie comme pouvant être productrice de ce type d'enzyme pour une CMI > 0,5 mg/L ou pour un diamètre d'inhibition < 28 mm (Tableau 19).

Antibiotiques	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15
Ertapénème	10 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 28	< 26
Doripénème	10 µg	≤ 7	> 4	≥ 24	< 19

Tableau 19 : Concentrations et diamètres d'inhibition critiques pour des souches d'entérobactéries pour les carbapénèmes [CASFM 2012] avec l'ertapénème à prendre en compte comme meilleur marqueur de détection des carbapénémases de type OXA-48.

L'annexe 1 du CASFM 2012 conseille les laboratoires de bactériologie quant à la détection de souches productrices de carbapénémases, mais ne donne pas un algorithme unique de détection. En effet, elle précise bien qu'on dispose à ce jour de plusieurs techniques phénotypiques pour détecter les carbapénémases chez les entérobactéries, mais que les performances exactes de ces techniques en termes de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives et rapports de vraisemblance n'ont pas encore été suffisamment évaluées. C'est pourquoi, la méthode de référence pour la détection des carbapénémases reste la technique génotypique d'amplification du gène codant pour la carbapénémase [Annexe 1 du CASFM 2012]. Il paraît intéressant de voir, grâce aux résultats de notre étude, quelles méthodes phénotypiques peuvent être utilisées pour suspecter des souches comme produisant une carbapénémase de type OXA-48, avant la confirmation par une méthode génotypique.

Le système Vitek2<sup>®</sup> permet d'obtenir les résultats au maximum après 18h d'incubation. Il s'agit donc de la méthode phénotypique la plus rapide. Cependant, une des CMI de l'ertapénème obtenue en routine par la méthode phénotypique semi-automatisée n'a pas permis de catégoriser la souche correspondante « R » et donc potentiellement productrice de carbapénémase de type OXA-48. Par contre, pour la méthode manuelle des disques, même si 24h d'incubation ont été nécessaires, toutes les souches ont été catégorisées « R » grâce à l'ertapénème dès la première lecture. Pour la méthode des E-tests<sup>®</sup>, même si cette technique s'est avérée être sensible, le problème vient du fait de l'incubation prolongée nécessaire (24h supplémentaires) pour une catégorisation de toutes les souches « R » avec l'ertapénème.

Au total, c'est donc bien la méthode de diffusion en gélose avec un disque d'ertapénème qui s'avère être la méthode phénotypique à la fois la plus sensible (versus méthode automatisée avec système Vitek2<sup>®</sup>) et la plus rapide (versus diffusion en gélose avec E-test<sup>®</sup>) quant à la détection de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase de type OXA-48. Parmi ces trois méthodes, il peut donc être suggéré d'utiliser la méthode manuelle de diffusion en gélose avec un disque d'ertapénème afin d'optimiser le délai de rendu des résultats pour une souche suspectée d'être productrice de carbapénémase de type OXA-48. Au vu des résultats de notre étude, il peut être proposé d'utiliser, en association, la méthode en milieu liquide avec le système Vitek2<sup>®</sup> et la méthode manuelle avec un disque d'ertapénème. Sur la base de notre travail expérimental, cette association aurait permis une détection de toutes les souches d'entérobactéries suspectes avec un délai de 24h.



## **IV.2. Perspectives plus générales**

### **IV.2.1. Place des méthodes phénotypiques pour la détection des carbapénémases, incluant celles de type OXA-48**

Même si notre étude a permis de détecter toutes les souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase de type OXA-48, on est en mesure de se demander quels résultats auraient été obtenus avec un plus grand nombre de souches et avec d'autres types de carbapénémases. Les données de la littérature montrent bien que les carbapénémases sont difficiles à détecter, en particulier, celles appartenant à la classe D. Parmi celles-là, les  $\beta$ -lactamases de type OXA-48 posent un problème de détection du fait d'une possible légère diminution isolée de la sensibilité aux carbapénèmes si elles ne sont pas associées à un autre mécanisme de résistance. Afin de pallier l'insuffisance de résultats des méthodes phénotypiques, il vaut mieux associer plusieurs méthodes pour être sûr de détecter toute souche comme étant suspecte de produire une carbapénémase [Bulik *et al.* 2010, Fisher *et al.* 2009, Stone *et al.* 2007, Vading *et al.* 2010]. D'autres méthodes phénotypiques que celles étudiées dans le travail existent et peuvent être disponibles dans tout laboratoire en routine. Il paraît intéressant, d'un point de vue théorique, de proposer une conduite à tenir dans un laboratoire de bactériologie quant aux méthodes à utiliser pour la détection de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases ; même si on sait qu'à l'heure actuelle, il est impossible de trouver un algorithme suffisamment simple et peu onéreux pour être utilisé dans n'importe quel laboratoire pour la détection de ce type de souche.

Lors de ce phénomène épidémique, au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy, l'ensemble des tests phénotypiques pratiqués en routine sur les souches suspectes avaient été les suivants :

- Système Vitek2<sup>®</sup>, logiciel 04.02
- Disque d'ertapénème sur gélose MH
- Disque d'ertapénème sur gélose MH/cloxacilline (la cloxacilline permet de s'affranchir de la présence d'une éventuelle céphalosporinase)
- Test de Hodge
- +/- CMI (par technique E-test<sup>®</sup>)

Les souches du travail expérimental avaient donc fait l'objet d'une étude par le test de Hodge qui s'était révélé toujours positif. Ce test semble en effet être une méthode phénotypique intéressante complétant bien la recherche de la présence éventuelle d'une carbapénémase de type OXA-48 grâce à sa forte valeur prédictive négative [Girlich *et al.* 2011, Seah *et al.* 2011].

Il en est de même pour la méthode manuelle de diffusion en gélose avec un disque d'ertapénème sur milieu MH/cloxacilline. Les résultats de la routine n'objectivaient pas de récupération d'activité de l'ertapénème sur ce milieu ce qui n'était pas en faveur d'une production par les souches de céphalosporinase de haut niveau.

Au laboratoire de bactériologie du CHUN, l'algorithme de détection suivi lors de l'épidémie avait bien permis de suspecter toutes les souches produisant une carbapénémase de type OXA-48. Cela avait fait poursuivre les recherches pour la confirmation du mécanisme de résistance par biologie moléculaire. En ce qui concerne les nouveaux tests phénotypiques sortis récemment, aucun n'est encore réellement apte à la détection de telles souches. Le kit Rosco Diagnostica<sup>®</sup>, par exemple, ne détecte pas les souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase de type OXA-48. De plus, il n'existe pas encore d'inhibiteur spécifique utilisable pour la caractérisation d'enzyme de classe D comme l'OXA-48. Les milieux de screening, quant à eux, n'ont pas été encore suffisamment évalués et améliorés pour une détection sûre et une utilisation en routine seuls. Notre étude permet, d'une part, de confirmer l'algorithme utilisé par le CHUN au moment de l'épidémie et prouve aussi que la méthode phénotypique la plus sensible concernant la détection des souches productrices d'OXA-48 est la technique manuelle de diffusion en gélose avec un disque d'ertapénème et une lecture après 24h d'incubation ; la lecture à 24h du disque d'ertapénème sur milieu MH restant suffisante sans incubation supplémentaire. Cependant, notre travail expérimental n'étudie pas les autres carbapénémases pour lesquelles la sensibilité de l'ertapénème reste à vérifier.

Pour les autres carbapénémases que celles appartenant à la classe D, la détection s'avère tout de même moins difficile. En effet, la diminution de sensibilité aux carbapénèmes est souvent plus marquée [Ledent *et al.* 1993, Nordmann *et al.* 2010, Philippon *et al.* 2006, Poirel *et al.* 2010, Walther-Rasmussen *et al.* 2006]. De plus, comme nous l'avons développé précédemment, il existe des kits spéciaux permettant une détection propre à chaque enzyme

en fonction de ses propriétés. Pour la classe A, les enzymes de type KPC par exemple, peuvent être détectées avec le kit Rosco Diagnostica® [Giske *et al.* 2011] grâce à leur propriété d'être inhibées par l'acide boronique. Les métallo-β-lactamases peuvent, quant à elles, être détectées grâce à leur propriété d'être inhibées par l'EDTA [Hsueh *et al.* 2010, Nordmann *et al.* 2010, Nordmann *et al.* 2012] ou l'acide dipicolinique [Giske *et al.* 2011] (voir aussi II.3.4).

Dans la littérature, on peut trouver différents algorithmes pour la détection phénotypique des carbapénémases de toute classe, comme par exemple celui suivi par le Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques de Besançon (Figure 29).

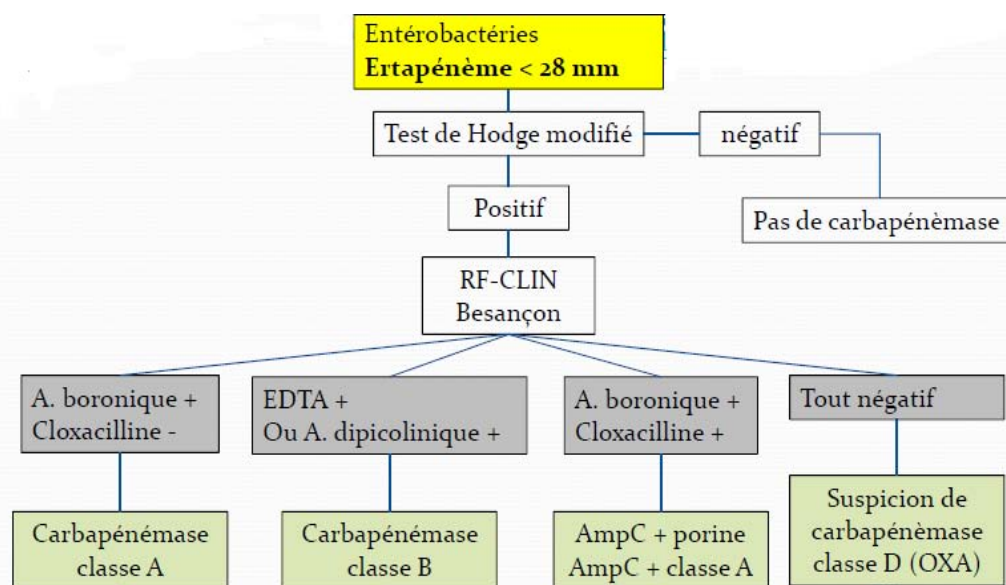


Figure 29 : Arbre décisionnel pour la détection des carbapénémases [d'après le CNR de la Résistance aux Antibiotiques – Institut Pasteur (CRAB IP) – Patrice Courvalin]

Concernant la sensibilité du disque d'ertapénème, elle avait été étudiée auparavant pour des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. coli* productrices de carbapénémase de classe A de type KPC avec de bons résultats versus méthodes automatisées ou milieux d'enrichissement sélectifs [Anderson *et al.* 2007, Lolans *et al.* 2010, Vading *et al.* 2010], mais à associer néanmoins à un test de Hodge [Anderson *et al.* 2007].

La détection des carbapénémases dépend de l'équipement de base disponible dans un laboratoire. Les méthodes phénotypiques disponibles dans les laboratoires actuellement sont cependant insuffisantes. Pour mettre en évidence de tels mécanismes de résistance pour des

souches d'entérobactéries, cela nécessite d'utiliser, d'une part, des techniques à fortes valeurs prédictives négatives et, d'autre part, suffisamment sensibles pour contrer la moindre spécificité des tests permettant la détection des carbapénémases. Cela souligne l'importance d'utiliser des algorithmes. Néanmoins, ces derniers posent des problèmes de standardisation quant aux différentes techniques mises à disposition [Miriagou *et al.* 2010] et nécessitent un bon contrôle des tests utilisés dans chaque laboratoire. De plus, par rapport à l'obtention du mécanisme de résistance de la souche suspecte, le délai de rendu du résultat au clinicien reste relativement long après réception du prélèvement.

Une autre méthode phénotypique, non encore disponible dans beaucoup de laboratoires, semble prometteuse. Il s'agit de la méthode spectrophotométrique, avec par exemple le Maldi-Tof<sup>®</sup> (voir aussi II.3.4) [Burckhardt *et al.* 2011, Carbonnelle *et al.* 2011, Hrabak *et al.* 2011, Hrabak *et al.* 2012]). Cette technique permet de détecter tous les types de carbapénémases, y compris les OXA-48 [Hrabak *et al.* 2012]. Cependant, même si cette méthode nous permet de dire qu'on est en présence d'une carbapénémase grâce à la dégradation du carbapénème et des éventuels spectres des produits de dégradation des carbapénèmes qu'on peut obtenir, elle ne nous permet en aucun cas de présumer du type de carbapénémase produite par la souche en question. Cela nous oblige donc quand même à recourir à une méthode de caractérisation génotypique par biologie moléculaire pour confirmer le mécanisme de résistance. Au moins, cette méthode présente l'avantage d'éliminer une carbapénémase en cas de résultat négatif et permet d'améliorer la détection de carbapénémase, en termes de délai de rendu du résultat, pour l'hygiène, quant à l'isolement du malade ; même si elle n'apporte rien au clinicien, quant au traitement à mettre en œuvre.

#### **IV.2.2. Carbapénémases et OXA-48 : problème de santé publique**

Le problème de multirésistance est actuellement un problème crucial de santé publique, non pas seulement pour le bactériologiste, mais aussi pour le clinicien et pour l'hygiéniste. En effet, ces BMR émergent, puis diffusent très rapidement ; une concertation pluridisciplinaire s'impose pour enrayer leur dissémination hospitalière ou communautaire [Dimou *et al.* 2012], mais en tout cas mondiale.

#### IV. 2.2.1. Aspect thérapeutique

En ce qui concerne le traitement, la plupart des souches d'entérobactéries produisant une carbapénémase ont un phénotype de multirésistance aux antibiotiques qui limite très fortement les possibilités thérapeutiques, que ce soit à l'hôpital, en clinique et encore plus dans le milieu communautaire. Cette multirésistance est, en partie, due à l'association fréquente de la carbapénémase à une BLSE, comme c'est souvent le cas pour OXA-48. Elle peut aussi être la conséquence d'une association à d'autres mécanismes de résistance, comme par exemple une altération des porines. Quand les deux possibilités sont associées, les souches peuvent alors être pan-résistantes et confrontent les cliniciens à une impasse thérapeutique [Grall *et al.* 2011]. L'accumulation de mécanismes de résistance divers est fréquente pour les isolats producteurs d'OXA-48 qui pourraient voir leur niveau de résistance augmenter encore, du fait de mutations susceptibles d'apparaître au fur et à mesure de l'émergence de nouvelles souches [Miriagou *et al.* 2010, Poirel *et al.* 2012].

En pratique, les possibilités thérapeutiques face aux souches productrices de carbapénémases se limitent souvent, au mieux, à certains aminosides, à la tigécycline, à la colistine, à la fosfomycine voire à certaines quinolones [Falagas *et al.* 2011, Heller *et al.* 2011, Kaase *et al.* 2011]. La mortalité semble être d'autant plus faible que les thérapeutiques associent deux antibiotiques auxquels la souche reste sensible. Dans notre étude, les souches étaient toutes sensibles à la colistine et certaines restaient sensibles à la tigécycline. De plus, en fonction des clones et des isolats, la résistance aux autres antibiotiques était variable pour les souches d'entérobactéries étudiées productrices d'OXA-48.

Les CMI des carbapénèmes pour les souches productrices de carbapénémases sont assez variables d'une molécule de carbapénème à l'autre. Cela était d'ailleurs le cas dans notre travail pour les entérobactéries productrices d'OXA-48. Cette variabilité des niveaux de résistance a suggéré l'utilisation possible de certains carbapénèmes, lorsque la CMI est faible, dans le traitement d'infections dues à de telles souches [Gary *et al.* 2010]. Par exemple, dans les cas où les souches exprimant OXA-48 ne possèdent pas également de BLSE, les niveaux de résistance aux carbapénèmes sont bas ce qui peut faire envisager leur utilisation [Kosmidis *et al.* 2012] (voire l'utilisation de céphalosporines large spectre seules [Jorgenson *et al.* 2011, Poirel *et al.* 2012] ou associées à d'autres antibiotiques : céfotaxime et amikacine par exemple

[Levast *et al.* 2011], puisque les C3G peuvent être sensibles dans ces cas). Cependant, une résistance aux carbapénèmes, acquise sous traitement, a été déjà rapportée [Skurnik *et al.* 2010, Thiolas *et al.* 2005]. Il n'y a pas encore beaucoup de recul quant au traitement des infections à *K. pneumoniae* et aux autres entérobactéries productrices d'OXA-48. En tout cas, l'échec thérapeutique de l'utilisation des carbapénèmes est notable au moins dans un certain nombre de cas [Carrër *et al.* 2008, Cuzon *et al.* 2009]. L'utilisation des carbapénèmes paraît donc quand même limitée, encore plus du fait que les études ne sont pas assez nombreuses.

Le risque d'impasse thérapeutique est réel, cela d'autant plus qu'il n'existe pas de perspectives proches de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques actifs sur les bactéries Gram négatif, et en particulier sur les EPC [Cattoir *et al.* 2009]. En effet, de nouvelles molécules dirigées notamment contre les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline sont développées de nos jours, et de nombreux essais cliniques sont en cours à ce sujet. Par contre, pour le développement de nouveaux traitements visant les bacilles Gram négatif, comme les EPC, la situation est tout autre. Cela est dû à plusieurs raisons : d'une part, la facilité qu'ont ces bactéries à s'échanger leurs gènes de résistance aux antibiotiques et d'autre part, la nécessité pour les antibiotiques de traverser la membrane externe de ces bactéries Gram négatif pour arriver sur le lieu de leur action. De plus, le développement de nouveaux antibiotiques basé sur la biologie, tels que la thérapie par les phages ou même les ARN anti-sens, paraît peu probable. En effet, la plasticité génétique des bactéries va limiter tout développement dans ce domaine [Nordmann *et al.* 2012]. Seules des molécules traditionnellement synthétisées selon la base chimique pourraient ouvrir de nouvelles voies pour l'antibiothérapie. Ces nouvelles molécules peuvent résulter, par exemple, de l'identification de nouvelles cibles dans le métabolisme bactérien, ou encore de l'analyse de molécules pouvant interagir avec le site actif des carbapénémases. A titre d'exemple, NXL104 peut inhiber l'activité de carbapénémases de classe A (incluant celles de type KPC) et de carbapénémases de classe D [Cattoir *et al.* 2011, Livermore *et al.* 2011]. Des essais sont en cours et le défi au cours des prochaines années sera la course entre la création de nouvelles molécules efficaces et la propagation de carbapénémases dans le monde entier. Le BAL30376, composé complexe associant monobactames et acide clavulanique [Falagas *et al.* 2011], peut également être une source d'espoir pour le traitement de patients infectés par de telles souches [Livermore *et al.* 2010].

Des associations sont testées, mais aucun essai n'a été réellement concluant. Le nouvel inhibiteur NXL104, associé à une céphalosporine ou à un carbapénème, aurait une bonne efficacité dans le traitement d'infections à entérobactéries productrices de KPC ou d'OXA-48 plus ou moins associées à une production de BLSE comme CTX-M [Livermore *et al.* 2008]. Des associations avec la ceftazidime ou l'aztréonam [Livermore *et al.* 2011] ou encore avec la ceftaroline sont aussi à l'étude [Mushtaq *et al.* 2010]. Notons que certaines souches d'EPC produisant OXA-48 peuvent parfois rester sensibles aux céphalosporines, comme nous l'avons détaillé auparavant, ce qui suggère d'autant plus l'utilisation de ces molécules, notamment de la ceftazidime, dans ces cas [Falagas *et al.* 2011].

Malgré l'impasse thérapeutique à laquelle est confronté le thérapeute, le taux de mortalité attribuable aux infections avec OXA-48 est encore inconnu à l'heure actuelle.

#### **IV.2.2.2. Aspect épidémiologique, mesures d'hygiène**

Bien que la surveillance épidémiologique ne cesse de se développer au fur et à mesure des années depuis l'apparition de ces nouveaux mécanismes de résistances très divers et de dissémination facilitée et gravissime, l'épidémie nancéenne portant sur des souches OXA-48 a été découverte fortuitement durant la période 2009/2011 sur des souches aux phénotypes de résistance inhabituels qui ont mené les biologistes à des investigations plus poussées. Cela montre la nécessité de développer encore la surveillance de l'émergence de telles souches pour ne pas les négliger et les faire diffuser à bas bruit.

En France, cette démarche avait été entamée à cause de l'émergence de souches produisant des carbapénémases de type KPC, puis de type NDM-1. Elle a été d'autant plus poursuivie lorsque des phénomènes épidémiques causés par des souches produisant des carbapénémases de type OXA-48 ont été observés en France.

De nombreuses enquêtes sont mises en place, par exemple par l'InVS (Ex : enquête SPA-Carb 2011 (octobre-novembre-décembre) concernant la surveillance de la prescription des carbapénèmes, enquête trans-réseaux ONERBA (novembre 2011 - mai 2012) concernant l'étude de sensibilité aux carbapénèmes chez les entérobactéries), ainsi que des

recommandations sur les dépistages par le HCSP. Un isolement le plus rapide possible des patients porteurs ou atteints est nécessaire pour éviter la dissémination de telles souches. Des mesures d'hygiène sont diffusées dans tous les services de santé régulièrement. Aucun consensus n'existe encore au niveau mondial concernant la gestion des épidémies. Chaque pays, voire même plutôt chaque région, essaye de mettre en place diverses mesures d'hygiène concernant l'isolement des patients, les précautions « contact » probabilistes en cas de suspicion de telles souches, les prélèvements rectaux de dépistage [Pirs *et al.* 2011]... En Lorraine notamment, depuis l'épidémie OXA-48, le Cclin Est met en ligne des informations relatives aux EPC (par exemple dépistage rectaux à J1, J8 et J15 en cas d'EPC confirmée dans un service [<http://www.cclin-est.org/spip.php?rubrique242>]). De plus, des liens vers des fiches de procédures (dépistage...) ou de prises en charge (transferts de patients infectés ou colonisés par des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48...) sont également disponibles sur le site du Cclin Est [<http://www.cclin-est.org/>]. Un lien vers les recommandations du HCSP émises en juillet 2010 sur la prise en charge des patients rapatriés de l'étranger est également d'accès facile sur le site [[http://www.cclin-est.org/IMG/pdf/hcspr20100518\\_bmrimportees.pdf](http://www.cclin-est.org/IMG/pdf/hcspr20100518_bmrimportees.pdf)].

Diverses fiches ont été diffusées dans les hôpitaux après l'épidémie nancéienne, concernant par exemple les « recommandations pour patients transférés depuis une unité de soins où il y a OXA-48 », ou encore les « recommandations concernant la liste des services et EHPAD lorrains concernés par une entérobactérie BLSE / OXA-48 » (mise à jour le 29/07/2011).

Les épidémies sont de gestion difficile et la place de l'outil moléculaire dans ces épidémies peut être discutée : cet outil existe, mais quand doit-on l'utiliser ? En tout cas, une orientation la plus rapide possible pour le clinicien est importante afin d'avoir une idée du traitement qui pourrait être donné au patient ; l'ajustement de la thérapeutique à 48/72 heures, notamment en service de réanimation, est primordial pour une prise en charge optimale.

La circulaire n° DGS/RI/DGOS/PF/2010/413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesures de contrôle des cas importés d'EPC impose aux établissements de santé de déclarer à l'ARS et au Cclin toute identification microbiologique d'EPC, qu'elle corresponde à une infection ou à une colonisation.



## V - Conclusion

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries, indépendamment du mécanisme, pose des problèmes d'ordres clinique et thérapeutique, mais la résistance par production de carbapénémases est la plus inquiétante [Grall *et al.* 2011]. Pour cause, ces enzymes appartenant à un groupe très hétérogène, sont codées par des gènes pouvant être situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, intégrons) permettant ainsi une dissémination rapide, comme c'est le cas de l'OXA-48. Le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> est situé sur un transposon (Tn1999) entouré de deux séquences d'insertion identiques (IS1999) jouant un rôle dans la mobilité et l'expression du gène [Aubert *et al.* 2006]. Les vecteurs de la diffusion des carbapénémases (KPC, VIM, IMP, NDM-1 ou OXA principalement) peuvent être les gènes [Benouda *et al.* 2010], mais aussi les souches en elles-mêmes (diffusion clonale des entérobactéries [Condon *et al.* 2011, Dimou *et al.* 2012, Dortet *et al.* 2012, Poirel *et al.* 2011]). En plus de leur important pouvoir de dissémination, ces souches sont souvent multirésistantes. Quand le support du gène codant ces enzymes est plasmidique, le plasmide peut porter d'autres gènes de résistance, notamment aux aminosides, aux fluoroquinolones (gènes *qnr*) [Miriagou *et al.* 2010, Nazic *et al.* 2005]... Cela permet un co-transfert de gènes de résistance à d'autres antibiotiques [Nordmann *et al.* 2009]. De plus, une association à d'autres mécanismes de résistance, portés par ces mêmes gènes ou d'autres gènes, comme d'autres  $\beta$ -lactamases (CTX-M15...) par exemple, ou encore la modification de la perméabilité membranaire [Matar *et al.* 2010] peuvent également conférer une résistance encore plus forte aux carbapénèmes ou une résistance à d'autres antibiotiques pour des isolats déjà producteurs de carbapénémases. Les mécanismes de résistance s'associent et s'accumulent alors pour une même souche et souvent, seule la colistine ou la tigécycline restent encore parfois efficaces...

La prévalence des carbapénémases est en constante augmentation. Ces enzymes hydrolysant les carbapénèmes ont déjà une distribution géographique mondiale, qui a tendance à s'étendre sans cesse, entre autres à cause des mouvements de population [Dimou *et al.* 2012], et en particulier l'importation de patients infectés dans des hôpitaux de tout horizon. Il est ainsi nécessaire d'appliquer les récentes recommandations du HCSP et de dépister

activement les patients en provenance de zones endémiques ; cela afin d'éviter aussi un passage encore plus important vers le milieu communautaire qui amènerait à des impasses thérapeutiques à tout niveau. Le contrôle de ces BMR nécessite d'agir sur de nombreux facteurs (pression de sélection aux antibiotiques, mesures d'hygiène et notamment lutte contre le péril fécal, contrôle de l'alimentation et des effluents...).

La surveillance de ces souches, notamment en France, est active depuis maintenant quelques années pour éviter leur émergence et leur dissémination. Elle est difficile à suivre, et en particulier pour les isolats producteurs d'enzyme de type OXA-48, du fait de la difficulté de mise en évidence de ces  $\beta$ -lactamases. Les mesures de précautions contact, d'isolements et de dépistages rectaux sont maintenant bien appliquées, suite aux recommandations de la Société Française d'Hygiène Hospitalière. Néanmoins, la difficulté d'identifier l'OXA-48 par les méthodes phénotypiques et l'absence de culture sur les milieux classiques de dépistage des BMR font craindre à une dissémination risquant de passer à travers les « mailles » des recommandations [Carrër *et al.* 2010].

Ces recommandations sont de deux types : d'une part pour le dépistage et d'autre part pour la détection des EPC. Le HCSP a émis des recommandations depuis mai 2010 concernant le dépistage des carbapénémases du fait de leur caractère émergent, de leur pouvoir de dissémination épidémique et de leur pathogénicité [Grall *et al.* 2011]. En tout cas, qu'elle soit isolée de prélèvements à visée diagnostique ou à visée de dépistage, toute souche de sensibilité diminuée aux carbapénèmes doit bénéficier d'une analyse phénotypique, puis moléculaire, des mécanismes de résistance. De plus, lors de la détection d'une souche productrice de carbapénémase en dehors d'un contexte épidémique, un dépistage large et systématique doit être mis en place après l'identification précise de la souche et de l'enzyme produite. L'identification de telles bactéries doit également faire l'objet d'un signalement à l'ARS et au CClin [Circulaire du 06/12/2010].

La détection de telles souches s'avère délicate devant la multitude de phénotypes et ne peut être uniquement basée sur le profil de résistance [Grall *et al.* 2011, Miriagou *et al.* 2010]. Chez les entérobactéries, l'ertapénème, dont les valeurs seuils sont les plus basses [EUCAST / CASFM 2012, CLSI 2012], semble être le meilleur marqueur de détection de ces enzymes.

Cependant, des faux positifs peuvent être dus à une hyperproduction de céphalosporinase de type AmpC ou de BLSE de type CTX-M, associée à une altération des porines.

Pour les carbapénémases, et surtout celles de classe D, il est important de trouver les meilleurs tests phénotypiques pouvant mettre sur la voie de la production de telles enzymes par des souches avant une confirmation par biologie moléculaire. Cela évite d'étudier directement par méthodes génotypiques toutes les souches et permet de se limiter aux souches suspectes. De toute façon, même en étudiant toutes les souches par biologie moléculaire, on risquerait de ne pas détecter certains gènes en cas d'une enzyme inconnue à ce jour, par exemple (à part pour le séquençage). De nombreuses mutations ont souvent lieu et de nouvelles enzymes peuvent apparaître. Même ne serait-ce qu'une seule substitution dans le génome bactérien peut empêcher une sonde de s'hybrider sur sa cible et le gène codant l'enzyme n'est alors pas détecté. En effet, la caractérisation génotypique a l'inconvénient de ne trouver que ce qu'elle cherche à moins de faire du séquençage systématique, ce qui est bien sûr impossible en pratique de routine. Disposant de méthodes phénotypiques satisfaisantes, l'idéal serait que tous les laboratoires puissent repérer les souches suspectes pour les envoyer pour confirmation du mécanisme de résistance dans des laboratoires plus spécialisés. En effet, il n'y a que la biologie moléculaire qui permette de nos jours de confirmer ou d'infirmer les hypothèses posées par les méthodes phénotypiques : confirmation par PCR (PCR classique et/ou multiplex [Mostachio *et al.* 2009, Poirel *et al.* 2011]) ou amplification des gènes recherchés et hybridation sur puces à ADN (comme au CHU depuis l'épidémie par le kit « Check MDR<sup>®</sup> » [Naas *et al.* 2011]). La biologie moléculaire présente des avantages, mais elle a un certain nombre d'inconvénients non négligeables pour les laboratoires, notamment en termes de coût et de disponibilité (tous les laboratoires ne peuvent pas être équipés). De plus, l'émergence sans cesse de nouveaux mécanismes de résistance nous prouve l'intérêt des tests phénotypiques. Le monde bactérien est en pleine émergence et les bactéries présentent parfois plus de 10 à 12 mécanismes de résistance dans une même souche. Cela rend la détection de plus en plus complexe. Il faut aussi se méfier des mécanismes de résistance associés, car ils peuvent cacher la carbapénémase ou mimer son activité. Malheureusement, même lorsque la souche d'EPC ne présente pas plusieurs mécanismes de résistance associés, la sensibilité diminuée aux carbapénèmes sans que les C3G ne soient forcément affectées, n'aide pas non plus à la détection ! De quelque manière que ce soit, la détection des OXA-48 n'est pas simple...

Ne pouvant pas étudier toutes les souches produisant des carbapénémases (et encore moins tous les mécanismes de résistance aux carbapénèmes) et sachant que les carbapénémases de classe D sont les plus difficiles à mettre en évidence, nous avons donc concentré notre étude sur les différents phénotypes des souches bactériennes exprimant la carbapénémase OXA-48 isolées lors d'une épidémie.

Notre étude a permis de confirmer l'intérêt de la méthode phénotypique avec un disque d'ertapénème sur gélose MH avec une lecture à 24h, quant à la détection de ces carbapénémases. Cette méthode s'avère être plus rapide que celle des E-tests<sup>®</sup> où une lecture après une incubation prolongée de 48h est conseillée. Notre étude a aussi montré que les souches produisant une carbapénémase de type OXA-48 pouvaient présenter une hétérogénéité de résistance ou que l'apparition de la résistance pouvait être plus tardive. Cela laisse suggérer qu'une incubation prolongée pourrait être quand même nécessaire pour certaines souches. Outre cela, on peut considérer que le test de Hodge a son importance dans les méthodes de détection phénotypique grâce à sa forte valeur prédictive négative ; il a sa place dans un algorithme de détection de carbapénémase. Tout cela nous confirme qu'il faut associer les méthodes phénotypiques pour avoir une plus forte chance de détecter les souches potentiellement productrices de telles enzymes.

Bien sûr en plus de l'intérêt du phénotypique, il faut aussi penser au fait que la détection doit être faite en considérant différents points de vue : à la fois celui de la « paillasse » qui est fonction de l'équipement de base, de la possibilité de recours à la biologie moléculaire, et également celui du clinicien, en termes de traitement (clinique/hôpital) et d'hygiène (isolement). En effet, il faut tenir compte du délai de rendu des résultats qui est un critère important pour les cliniciens et hygiénistes, respectivement, pour instaurer un traitement adéquat dans les plus brefs délais et réaliser un isolement le plus rapide possible du patient afin de ne pas disséminer de telles souches. La course permanente entre résistance bactérienne d'une part et développement de nouvelles molécules d'autre part, ayant commencé dès lors de l'utilisation excessive des  $\beta$ -lactamines, est encore plus d'actualité aujourd'hui avec les carbapénémases qui nous mènent vers une impasse thérapeutique catastrophique... Sans compter que toutes ces  $\beta$ -lactamases, et a fortiori les carbapénémases, confèrent une résistance, ne serait-ce qu'à l'une des  $\beta$ -lactamines au spectre le plus restreint, l'amoxicilline, qui peut jouer un rôle de facteur sélectif de maintien de ces marqueurs de

résistance [Nordmann *et al.* 2010]. Il est important à ce jour de prévenir, limiter et contrôler la diffusion de ces entérobactéries productrices de carbapénémases.

Le domaine de la microbiologie connaît une telle évolution des mécanismes de résistance que leurs compréhensions revêtent une réelle complexité. Une certaine spécialisation des biologistes semble donc importante et pose le problème de la formation des biologistes polyvalents. En hématologie, par exemple, il en est de même avec le développement de la cytométrie en flux. De plus, un microbiologiste peut-il correctement lire et interpréter un myélogramme, alors qu'il n'y est pas souvent confronté ? Une réelle polyvalence est-elle possible ? Cela souligne l'intérêt du Développement Professionnel Continu (DPC) : la formation continue d'un microbiologiste, que ce soit en secteur public dans les laboratoires de CH ou dans le secteur privé, est primordiale, du fait de l'évolution des mécanismes de résistance et des techniques bactériologiques en développement perpétuel.

## Références bibliographiques

- Adler A., Navon-Venezia S., Moran-Gilad J., Marcos E., Schwartz D. and Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for the detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *Journal of Clinical Microbiology* (2011) 49, 2239-2242
- Aktas Z., Bal Kayacan C., Schneider I., Can B., Midilli K. and Bauernfeind A. Carbapenem-Hydrolysing Oxacillinase, OXA-48, Persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* (2008) 54, 101-106
- Anderson K. F., Lonsway D. R., Rasheed J. K., Biddle J., Jensen B., McDougal L. K., Carey R. B., Thompson A., Stocker S., Limbago B. and Patel J. B. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2007) 45, 2723–2725
- Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale. Bactériologie, 11BAC1. Avril 2011. AFSSAPS (2012) 1-10
- Arlet G., Philippon A. Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboratoires* (2003) 352, 41-55
- Aubert D., Naas T., Héritier C., Poirel L. and Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of  $\beta$ -lactam resistance genes. *Journal of Bacteriology* (2006) 188, 6506-6514
- Benouda A., Touzani O., Khairallah M. T., Araj G. F. and Matar G. M. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (2010) 104, 327-330
- Bereksi N., Giraud D., Joyeux F., Barbaux L., Ghirardi S., Orenga S., Villeval F. and Zambardi G. Evaluation of a chromogenic medium, chromID CARBA<sup>®</sup>, for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. London, 22<sup>nd</sup> ECCMID (2012), Poster 1718
- Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases : the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2004) 48, 1-14
- Bonnet R. *Antibiogramme*, 3<sup>ème</sup> Edition - Chapitre 16 -  $\beta$ -lactamines et entérobactéries (2011) 165-188

- Bulik C. C., Fauntleroy K. A., Jenkins S. G., Abuali M., LaBombardi V. J., Nicolau D. P. and Kuti J. L. Comparison of Meropenem MICs and Susceptibilities for Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Various Testing Methods. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) 48, 2402–2406
- Burckhardt I. and Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of Clinical Microbiology* (2011) 49, 3321-3324
- Canton R., Akova M., Carmeli Y., Giske C.G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D.M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G.M., Samuelsen O., Seifert H., Woodford N. and Nordmann P. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* (2012) 18, 413-431
- Carbonnelle E. and Raskine L. Applications de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie. *Biotribune Mag* (2011) 39, 35-42
- Carrër A., Fortineau N. and Nordmann P. Use of ChromID<sup>®</sup> Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Medium for Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) 48, 1913–1914
- Carrër A., Poirel L., Eraksoy H., Cagatay A. A., Badur S. and Nordmann P. Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2008) 52, 2950-2954
- Carrër A., Poirel L., Yilmaz M., Arıkan Akan O., Feriha C., Cuzon G., Matar G., Honderlick P. and Nordmann P. Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2010) 54, 1369-1373
- Carvalhaes C. G., Pıcao R. C., Nicoletti A. G., Nicoletti A.G. and Gales C. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae* : be aware of false positive results. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2010) 65, 249-251
- Castanheira A. M., Deshpande L. M., Mathai D., Bell J. M., Jones R. N. and Mendes R. E. Early Dissemination of NDM-1 and OXA-181-Producing *Enterobacteriaceae* in Indian Hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2011) 55, 1274–1278
- Cattoir V. and Daurel C. Quelles nouveautés en antibiothérapie? *Médecine et Maladies Infectieuses* (2009) 2966, 1-20
- Cattoir V. Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation. MAPAR* (2008) 203-209

- Cattoir V. NXL04, un nouvel inhibiteur des  $\beta$ -lactamases à large spectre. *Journal des Anti-infectieux* (2011) 13, 20-24
- Cclin Est : [www.cclin-est.org](http://www.cclin-est.org) . Site consulté en 2012
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Recommandations* 2010, 2012
- Center for Disease Control (CDC). Modified Hodge Test for Carbapenemase Detection in *Enterobacteriaceae* (2009) 1-3
- 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 (EPC)
- Cohen Stuart J. and Leverstein-Van Hall M.A. on behalf of members of the Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2010) 36, 205-210
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). *Recommandations* 2010, 2011, 2012 et Annexe 1 du CASFM 2012 : Lettre d'information du CA-SFM concernant la détection de la production de carbapénémases chez les entérobactéries
- Condon I., Ludden C., Corcoran M., O'Connell N., Cormican M., Wee Boo T. and Morris D. Closely related Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* from hospital in patients and community in Mid-West of Ireland. London, 21<sup>nd</sup> ECCMID (2011), Poster 730
- Cuzon G., Naas T. et Nordmann P. Carbapénémases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique ? *Pathologie Biologie* (2010) 58, 39–45
- Cuzon G., Naas T., Bogaerts P., Glupczynski Y. and Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase OXA-48 in an Imipenem susceptible *K. pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2008) 52, 3463-3464
- Cuzon G., Naas T., Truong H., Villegas M-V., Wisell K. T., Carmeli Y., Gales A. C., Navon-Venezia S., Quinn J. P., and Nordmann P. Worldwide diversity of *K. pneumoniae* that produces  $\beta$ -Lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> Gene. *Emerging Infectious Diseases* (2010) 16, 1349-1356
- Cuzon G., Ouanich J., Gondret R., Naas T. and Nordmann P. Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2011) 55, 2420-2423
- Decre D., Birgand G., Geneste D., Maury E., Petit J.C., Barbut F., Arlet G. Possible importation and subsequent cross-transmission of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2010. *Euro Surveill.* [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org). (2010) 15, 1-2



- Denis C., Poirel L., Carricajo A., Grattard F., Fascia P., Verhoeven P., Gay P., Nuti C., Nordmann P. and Berthelot P. Nosocomial transmission of NDM-1 producing *E. coli* within a non-endemic area in France. *Clinical Microbiology and Infection* (2012) 18, 128-130
- Dimou V., Dhanji H., Pike R., Livermore D.M. and Woodford N. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48 like carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2012) 67, 1660-1665
- Docquier J.D., Calderone V., De Luca F., Benvenuti M., Giuliani F., Bellucci L., Tafi A., Nordmann P., Bolta M., Rossolini I.G.M. and Mangani S. Crystal Structure of the OXA-48  $\beta$ -Lactamase Reveals Mechanistic Diversity among Class D Carbapenemases. *Chemistry and Biology* (2009) 16, 540-547
- Dortet L., Poirel L., Al Yaqoubi F. and Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. *Clinical Microbiology and Infection* (2012) 18, 144-148
- Dubouix A. and Marty N. Détection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantages, limites. *Antibiotiques. Actualités biologiques*. Elsevier Masson (2004) 6, 193-201
- E-test<sup>®</sup> reading guide. Aerobic bacteria. AB Biodisks (2008)
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) – Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters – version 2.0, valid from 2012-01-01
- Falagas M.E., Karageorgopoulos D.E. and Nordmann P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolysing enzymes. *Future Microbiology* (2011) 6, 653-666
- Fisher M. A., Stamper P. D., Hujer K. M., Love Z., Croft A., Cohen S., Bonomo R. A., Carroll K. C. and Petti C. A. Performance of the Phoenix bacterial identification system compared with disc diffusion methods for identifying extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC and KPC producers. *Journal of Medical Microbiology* (2009) 58, 774–778
- Gary D. and Overturf M.D. Doripenem, an early look at a carbapenem not yet approved for pediatrics. *The pediatric Infectious Disease Journal* (2010) 29, 163-165
- Girlich D., Poirel L. and Nordmann P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2012) 50, 477-479
- Girlich D., Poirel L. and Nordmann P. Strategy of detection of carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae*. London, 22<sup>nd</sup> ECCMID (2012), Poster 2315

- Giske C. G., Gezelius L., Samuelsen O., Warner M., Sundsfjord A. and Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *K. pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection* (2011) 17, 552-556
- Glupczynski Y., Huang T. D., Bouchahrouf W., Rezende de Castro R., Bauraing C., Gérard M., Verbruggen A.M., Deplano A., Denis O. and Bogaerts P. Rapid emergence and spread of OXA-48 producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2012) 39, 168-178
- Gordon N.C. and Wareham D.W. Failure of the Microscan WalkAway System to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteriemia. *Journal of Clinical Microbiology* (2009) 47, 3024-3025
- Grall N., Andremont A. et Armand-Lefèvre L. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des anti-infectieux* (2011) 16, 1-16
- Gülmez D., Woodford N., Palepou M.F.I., Mushtaq S., Metan G., Yakupogullari Y., Kacagoz S., Uzun O., Hascelik G. and Livermore D.M. Carbapenem-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2008) 31, 523-526
- Halimi D., Martelin R., Sjostrom K., Pompilio M., Rivat S., Durand G. and Zambardi G. Evaluation of a new E-test strip for *K.pneumoniae* Carbapenemase (KPC) detection on a large collection of genotypically characterized strains. London, 22<sup>nd</sup> ECCMID (2012), Poster 1720
- Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) - Commission spécialisée Sécurité des patients : infections nosocomiales et autres évènements indésirables liés aux soins et aux pratiques. Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination (2010) 1-71
- Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) – Rapport : Les maladies infectieuses émergentes : état de la situation et perspectives (2011)
- Heller I., Grif K. and Orth D. Emergence of VIM-1-carbapenemase-producing *E. cloacae* isolates in the Tyrol, Austria. London, 21<sup>nd</sup> ECCMID (2011), Poster 1344
- Hrabak J., Studentova V., Walkova R. Zemlickova H., Jakupu V., Chudackova E., Pfeifer Y., Perry J.D., Wilkinson K. and Bergerova T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* (2012) 50, 2441-2443

- Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E. and Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* (2011) 49, 3222-3227
- Hsueh P. R. New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1): An Emerging Threat Among *Enterobacteriaceae*. *Journal of the Formosan Medical Association* (2010) 109, 685–687
- InVS 2012 : [www.invs.sante.fr /Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/EPC/Episodes-implicant-des-EPC-en-France.-Situation-epidemiologique-du-18-mai-2012](http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/EPC/Episodes-implicant-des-EPC-en-France.-Situation-epidemiologique-du-18-mai-2012), page consultée en juin 2012
- Jorgenson M.R., De Pestel D.D., Carvel P.R. Ceftaroline Fosamil: A Novel Broad-Spectrum Cephalosporin with Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The annals of Pharmacotherapy* (2011) 45, 1384-1398
- Kalpoe J. S., Al Naiemi N., Poirel L. and Nordmann P. Detection of an Ambler class D OXA-48-type  $\beta$ -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *Journal of Medical Microbiology* (2011) 60, 677-378
- Kaase M., Szabados F., Anders A. and Gatermann S.G. Fosfomycin susceptibility testing in *Enterobacteriaceae* producing KPC-2, OXA-48 and VIM-1 carbapenemases. London, 21<sup>nd</sup> ECCMID (2011), Poster 1173
- Kosmidis C., Poulakou G., Markogiannakis A. and Daikos G.L. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *European Infectious Disease* (2012) 28-34
- Lahlaoui H., Poirel L., Barguelli F., Moussa M.B. and Nordmann P. Carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -Lactamase OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tunisia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (2012) 31, 937-939
- Landman D., Bratu S. and Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *K. pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology* (2009) 58, 1303–1308
- Landman D., Salvani J. K., Bratu S. and Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *Journal of Clinical Microbiology* (2005) 43, 5639-5641
- Landman D., Urban C., Bäcker M., Kelly P., Shah N., Babu E. and Quale J. Susceptibility profiles, molecular epidemiology, and detection of KPC-Producing *E. coli* Isolates from the New York City Vicinity. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) 48, 4604-4607

- Ledent P., Raquet X., Joris B., Van Beeumen J. and Frère J-M. A comparative study of class-D  $\beta$ -lactamases. *Biochemical Journal* (1993) 292, 555-562
- Lee K., Chong Y., Shin H. B., Kim Y. A., Yong D. and Yum J. H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical and Microbiology Infection* (2001) 7, 88-91
- Levast M., Poirel L., Carrër A., Deiber M., Decroisette E., Mallaval F.O., Lecomte C. and Nordmann P. Transfer of OXA-48-positive-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2011) 944-945
- Livermore D.M., Mushtaq S. and Warner M. Activity of BAL30376 (monobactam + BAL19764 + BAL29880 + clavulanate) versus Gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2010) 65, 2382–2395
- Livermore D.M., Mushtaq S., Warner M., Miossec C. and Woodford N. NXL104 combinations versus *Enterobacteriaceae* with CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 62, 1053–1056
- Livermore D.M., Mushtaq S., Warner M., Zhang J., Maharjan S., Doumith M. and Woodford N. Activities of NXL104 Combinations with ceftazidime and aztreonam against Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2011) 55, 390-394
- Lolans K., Calvert K., Won S., Clark J. and Hayden M.K. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) 48, 836-841
- Matar G. M., Dandache I., Carrër A, Khairallah M. T., Nordmann P., Sabra A. and Araj G. F. Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum  $\beta$ -lactamase. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (2010) 104, 271-274
- McGettigan S. E., Andreacchio K. and Edelstein P. H. Specificity of Ertapenem Susceptibility Screening for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology* (2009) 47, 785–786
- Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein E., Galani I., Giske C., Gniadkowski M., Malamou-Lada E. and Canton R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens : detection and surveillance issues. *Clinical and Microbiology Infection* (2010) 16, 112-122

- Moquet O., Bouchiat C., Kinana A., Seck A., Arouna O., Bercion R., Breurec S., and Garin B. Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*, Senegal. *Emerging Infectious Diseases* (2011) 17, 143-144
- Mostachio A. K., Van der Heidjen I., Rossi F., Levin A. S. and Costa S. F. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo- $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of Medical Microbiology* (2009) 58, 1522-1524
- Muller M. P. Résistance des bactéries Gram négatif due aux bêta-lactamases. Toronto Medical Laboratories and Mount Sinai Hospital (2004) 3, 1-6
- Munoz-Price L.S. and Quinn J.P. The Spread of *K. pneumoniae* Carbapenemases: A Tale of Strains, Plasmids, and Transposons. *Clinical Infectious Diseases* (2009) 49, 1739-1741
- Mushtaq S., Warner M., Williams G., Critchley I. and Livermore D.M. Activity of checkerboard combinations of ceftaroline and NXL-104 versus  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2010) 65, 1428-1432
- Naas T., Cuzon G., Bogaerts P., Glupczynski Y. and Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for a rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology* (2011) 49, 1608-1613
- Nazic H., Poirel L. and Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2005) 49, 2146-2147
- Nordmann P. and Cornaglia G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : A call for action ! *Clinical Microbiology and Infection* (2012) 18, 411-412
- Nordmann P. Girlich D. and Poirel L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* using a novel screening medium. *Journal of Clinical Microbiology* (2012) 50, 2761-2766
- Nordmann P. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Médecine/Sciences* (2010) 26, 950-959
- Nordmann P., Carrër A., Les carbapénémases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie* (2010) 17, 154-162
- Nordmann P., Cuzon G., Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infectious Disease* (2009) 9, 228-236
- Nordmann P., Dortet L., Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* : here is a storm ! *Trends in Molecular Medicine* (2012) 18, 263-272

- Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C. G., Poirel L., Woodford N., Miriagou V. and the European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology and Infection* (2012) 18,432-438
- Nordmann P., Naas T. and Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* (2011) 17, 1791-1798
- Nordmann P., Poirel L., Carrër A., Toleman M.A. and Walsh T.R. How to Detect NDM-1 producers. *Journal of Clinical Microbiology* (2011) 49, 718-721
- Owona D., Woestyn S., Olive N., Gigi J., Delmée M. Evaluation de méthodes phénotypiques de détection de la résistance hétérogène de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline. *Immunoanalyse et Biologie Spécialisée* (2002) 17, 113-117
- Panagea T., Galani I., Souli M., Adamou P., Antoniadou A. and Giamarellou H. Evaluation of CHROMagar<sup>®</sup> KPC for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2011) 37, 124–128
- Philippon A. and Arlet G.  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Annales de Biologie Clinique* (2006) 64, 37-51
- Philippon A., Arlet G. Les  $\beta$ -lactamases chez les bacilles à Gram négatif : que de nouveautés en 15 ans ! Elsevier Masson Paris Antibiotiques (2005) 7, 247-259
- Philippon L.N., Naas T., Bouthors A.T., Barakett V. and Nordmann P. Oxa-18, a class D clavulanic-acid-inhibited extended spectrum  $\beta$ -Lactamase from *P. aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1997) 41, 2188-2195
- Pirs M., Andlovic A., Cerar T., Zohar-Cretnik T., Kobola L., Kolman J., Frelih T., Presern-Štrukelj M., Ruzic-Sabljić E. and Seme K. A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya, November 2011. *EuroSurveillance*. [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org) (2011) 16, 1-2
- Poirel L., Bernabeu S., Fortineau N., Podglagen I., Lawrence C. and Nordmann P. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2011) 55, 4937-4938
- Poirel L., Castanheira M., Carrër A., Parada Rodriguez C., Jones R. N., Smayevsky J. and Nordmann P. OXA-163, an OXA-48-Related Class D  $\beta$ -Lactamase with Extended Activity Toward Expanded-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2011) 55, 2546-2551

- Poirel L., Héritier C. and Nordmann P. Chromosome-Encoded Ambler Class D  $\beta$ -Lactamase of *Shewanella oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2004) 48, 348-351
- Poirel L., Héritier C., Tolün V. and Nordmann P. Emergence of Oxacillinase Mediated Resistance to Imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2004) 48, 15-22
- Poirel L., Naas T. and Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2010) 54, 24-38
- Poirel L., Potron A. and Nordmann P. OXA-48 like carbapenemases : the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2012) 67, 1597-1606
- Poirel L., Walsh T.R. and Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* (2011) 70, 119-125
- Potron A., Kalpoe J. and Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *K. pneumoniae* clone. *Clinical Microbiology and Infection* (2011) 17, 24-26
- Pournaras S., Ikonomidis A., Markogiannakis, Spanakis N., Maniatis A.N. and Tsakris A. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *Journal of Medical Microbiology* (2007) 56, 66-70
- Queenan A-M. and Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* (2007) 20, 440-458
- Roche C. and Crowley B. Investigation of Carbapenem Resistance in *K. pneumoniae* isolates from St. James's Hospital, Dublin, Ireland. London, 21<sup>nd</sup> ECCMID (2011), Poster 602
- Ruppé E., Armand-Lefèvre L., Lolom I., El Mniai A., Muller-Serieys C., Ruimy R., Woerther P.L., Bilariki K., Marre M., Massin P., Andremont A. and Lucet J.C. Development of a phenotypic method for detection of fecal carriage of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* after incidental detection from clinical specimen. *Journal of Clinical Microbiology* (2011) 49, 2761-2762
- Samra Z., Bahar J., Madar-Shapiro L., Aziz N., Israel S. and Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC<sup>®</sup> for rapid detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2008) 46, 3110-3111
- Seah C., Low D. E., Patel S. N. and Melano R. G. Comparative Evaluation of a Chromogenic Agar Medium, the Modified Hodge Test, and a Battery of Meropenem-Inhibitor Discs for Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2011) 49, 1965–1969

- Skurnik D., Lasocki S., Bremont S., Muller-Serieys C., Kitzis D., Courvalin P., Andremont A. and Montravers P. Development of ertapenem resistance in a patient with mediastinitis caused by *K. pneumoniae* producing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Journal of Medical Microbiology* (2010) 59, 115-119
- Sparbier K., Schubert S., Weller U., Boogen C. and Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrophotometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology* (2012) 50, 927-937
- Stone N. D., O'Hara C. M., Williams P. P., McGowan Jr. J. E. and Tenover F. C. Comparison of Disk Diffusion, VITEK 2<sup>®</sup>, and Broth Microdilution Antimicrobial Susceptibility Test Results for Unusual Species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2007) 45, 340-346
- Superti S. V., Martins D. S., Caierao J., Soares F. S., Prochnow T. and Zavascki A. P. Indications of Carbapenem Resistance Evolution Through Heteroresistance as an Intermediate Stage in *Acinetobacter baumannii* after Carbapenem Administration. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (2009) 51, 111–113
- Tato M., Morosini M., Garcia L., Alberti S., Coque M.T., and Canton R. Carbapenem Heteroresistance in VIM-1-Producing *K. pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) 48, 4089-4093
- Tenover F. C., Kalsi R. K., Williams P. P., Carey R. B., Stocker S., Lonsway D., Rasheed J. K., Biddle J. W., McGowan Jr. J. E. and Hanna B. Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Not Detected by Automated Susceptibility Testing. *Emerging Infectious Diseases* (2006) 12, 1209-1213
- Thiolas A., Bollet C., La Scola B., Raoult D. and Pagès J.M. Successive emergence of *E. aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2005) 49, 1354-1358
- Tsakris A., Kristo I., Poulou A., Markou F., Ikonomidis A. and Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 62, 1257–1260
- Tsakris A., Poulou A., Themeli-Digalaki K., Voulgari E., Pittaras T., Sofianou D., Pournaras S. and Petropoulou D. Use of Boronic Acid Disk Tests To Detect Extended-



Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Clinical Isolates of KPC Carbapenemase-Possessing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2009) 47, 3420-3426

- Vading M., Samuelsen O., Haldorsen B., Sundsfjord A. and Giske C.G. Comparison of disk diffusion, Etest<sup>®</sup> and VITEK2<sup>®</sup> for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clinical Microbiology and Infection* (2010) 17, 668-674
- Vaux S., Carbonne A., Thiolet J.M., Jarlier V., Coignard B. Raisin and Expert Laboratories Groups. Emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2004 to 2011. *Eurosurveillance* (2011) 16, 1-7
- Vrioni G., Daniil I., Voulgari E., Ranellou K., Koumaki V., Ghirardi S., Kimouli M., Zambardi G. and Tsakris A. Comparative Evaluation of a Prototype Chromogenic Medium (ChromID CARBA<sup>®</sup>) for Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Surveillance Rectal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* (2012) 50, 1841-1846
- Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. and Hrabak J. Carbapenemase identification by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrophotometry (MALDI-TOF MS<sup>®</sup>). London, 22<sup>nd</sup> ECCMID (2012), Poster 1714
- Walther-Rasmussen J. and Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2006) 57, 373-383
- Wilkinson K.M., Winstanley T.G., Lanyon C., Cummings S.P., Raza M.W. and Perry J.D. Comparison of Four Chromogenic Culture Media for Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2012) 50, 3102-3104
- Wolff M., Joly-Guillou M.L and Pajot O. Carbapenems. Comparative review of carbapenems. *Réanimation* (2009) 18, 199-208
- Woodford N., Eastaway A. T., Ford M., Leanord A., Keane C., Quayle R. M., Steer J. A., Zhang J. and Livermore D. M. Comparison of BD Phoenix<sup>®</sup>, Vitek2<sup>®</sup>, and MicroScan<sup>®</sup> Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) 48, 2999–3002

## Liste des Figures

Figure 1 : Hydrolyse du cycle $\beta$ -lactame.....	6
Figure 2 : Structure moléculaire des $\beta$ -lactamines.....	6
Figure 3 : Structure moléculaire des inhibiteurs de $\beta$ -lactamases.....	8
Figure 4 : Représentation schématique de « la course en avant » des $\beta$ -lactamases sous la pression des antibiotiques (selon Roland Leclercq).....	11
Figure 5 : Structure moléculaire du NXL104.....	12
Figure 6 : Distribution mondiale des souches productrices de KPC.....	25
Figure 7 : Distribution mondiale des souches productrices de NDM-1 au 15/07/2011.....	26
Figure 8 : Nombre d'épisodes impliquant des EPC par mois de signalement.....	27
Figure 9 : Diagramme des précurseurs des carbapénémases de type oxacillinase.....	28
Figure 10 : Représentation schématique de l'environnement génétique du gène <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> .....	29
Figure 11 : Répartition géographique des souches productrices de $\beta$ -lactamases de type OXA-48.....	32
Figure 12 : Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénémases.....	37
Figure 13 : E-test <sup>®</sup> MBL IP/IPI : imipénème $\pm$ EDTA.....	39
Figure 14 : Exemple de souche productrice de métallob $\beta$ -lactamase : différence de diamètre entre « MR+DP » et « MRP10 » égale à 5 mm.....	41
Figure 15 : Distribution des CMI (Vitek2 <sup>®</sup> ) d'imipénème (en mg/L) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=32).....	53
Figure 16 : Distribution des CMI (Vitek2 <sup>®</sup> ) d'ertapénème (en mg/L) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=31).....	54
Figure 17 : Distribution des CMI (E-test <sup>®</sup> ) d'imipénème (en mg/L) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	56
Figure 18 : Distribution des CMI (E-test <sup>®</sup> ) de méropénème (en mg/L) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	57
Figure 19 : Distribution des CMI (E-test <sup>®</sup> ) d'ertapénème (en mg/L) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	57
Figure 20 : Distribution des CMI (E-test <sup>®</sup> ) de doripénème (en mg/L) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	58

Figure 21 : Microcolonies proches de la bandelette à prendre en compte dans la détermination de la CMI d'un carbapénème pour une souche de <i>K. pneumoniae</i> productrice de carbapénémase de type KPC.....	59
Figure 22 : Exemple d'une souche de <i>K. pneumoniae</i> sur géloses MH avec bandelettes E-test <sup>®</sup> des quatre carbapénèmes à 24h (ertapénème « ETP », doripénème « DOR » / imipénème « IP », méropénème « MP »).....	60
Figure 23 : Exemple de lectures de CMI à 24h pour une souche de <i>K. pneumoniae</i> de l'étude : la souche est catégorisée « R » pour les deux antibiotiques (ertapénème = CMI ≥ 32 mg/L et doripénème = CMI à 1,5 mg/L).....	60
Figure 24 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoïd <sup>®</sup> ) de l'imipénème (en mm) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	63
Figure 25 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoïd <sup>®</sup> ) du méropénème (en mm) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	64
Figure 26 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoïd <sup>®</sup> ) de l'ertapénème (en mm) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	64
Figure 27 : Distribution des diamètres d'inhibition (disques Oxoïd <sup>®</sup> ) du doripénème (en mm) des souches de <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (n=38).....	65
Figure 28 : Exemple d'une souche de <i>K. pneumoniae</i> sur gélose MH avec disques Oxoïd <sup>®</sup> (10 µg) des quatre carbapénèmes à 24h (ertapénème « ETP », doripénème « DOR », imipénème « IPM », méropénème « ME »).....	66
Figure 29 : Arbre décisionnel pour la détection des carbapénémases.....	85

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales pénicillines associées ou non avec un IBL.....	7
Tableau 2 : Principales céphalosporines.....	8
Tableau 3 : Spectre d'activité des $\beta$ -lactamases de classe A.....	14
Tableau 4 : Principales carbapénémases produites par des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif.....	21
Tableau 5 : Principales carbapénémases chez les entérobactéries : support génétique, spectre d'hydrolyse et molécules actives.....	22
Tableau 6 : Variabilité des CMI de trois carbapénèmes chez des entérobactéries produisant différents types de carbapénémases.....	23
Tableau 7 : Phénotypes de résistance résultant de la production de carbapénémases chez des souches d'entérobactéries produisant ou non une BLSE associée.....	23
Tableau 8 : Autres $\beta$ -lactamases associées dans différentes souches de <i>K. pneumoniae</i> produisant une OXA-48 d'origines géographiques diverses.....	31
Tableau 9 : Interprétation des résultats du kit Rosco Diagnostica <sup>®</sup> , après les 24h d'incubation nécessaires, par la mesure des diamètres d'inhibition autour de chaque comprimé et la comparaison de la différence entre les différents diamètres.....	41
Tableau 10 : Caractéristiques des souches d'entérobactéries OXA-48 de l'étude (espèces, pulsotype, $\beta$ -lactamase CTX-M15 associée ou non et origine du prélèvement).....	49
Tableau 11 : Concentrations et diamètres critiques pour des souches d'entérobactéries pour les carbapénèmes [CASFM 2012].....	52
Tableau 12 : CMI (E-test <sup>®</sup> ) des quatre carbapénèmes (en mg/L) des autres souches d'entérobactéries OXA-48 du travail (n=5 : 2 <i>E. coli</i> , 1 <i>E. cloacae</i> , 1 <i>K. oxytoca</i> et 1 <i>E. aerogenes</i> ) et catégorisation des souches « S » (code couleur vert), « I » (code couleur violet) ou « R » (code couleur rouge).....	61
Tableau 13 : Diamètres d'inhibition (disques Oxoid <sup>®</sup> ) des quatre carbapénèmes (en mm) des autres souches d'entérobactéries OXA-48 du travail (n=5 : 2 <i>E. coli</i> , 1 <i>E. cloacae</i> , 1 <i>K. oxytoca</i> et 1 <i>E. aerogenes</i> ) et catégorisation des souches « S » (code couleur vert), « I » (code couleur violet) ou « R » (code couleur rouge).....	67

Tableau 14 : CMI (Vitek2 <sup>®</sup> ) d'ertapénème (en mg/L) des autres souches d'entérobactéries OXA-48 du travail (n=5 : 2 <i>E. coli</i> , 1 <i>E. cloacae</i> , 1 <i>K. oxytoca</i> et 1 <i>E. aerogenes</i> ) et catégorisation des souches « R » (code couleur rouge).....	69
Tableau 15 : Nombre de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase de type OXA-48 détectées grâce à l'ertapénème pour chaque méthode phénotypique.....	69
Tableau 16 : Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (en mm) et des CMI (en mg/L) pour les carbapénèmes en fonction des critères EUCAST / CLSI 2012 (versus CLSI 2010) et CASFM 2012.....	71
Tableau 17 : Différents profils de résistance observés pour les différentes souches d'entérobactéries OXA-48 de l'étude en fonction de différentes molécules d'antibiotiques céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), gentamicine (G), tobramycine (T), nétilmicine (N), amikacine (A), ciprofloxacine (CIP), nitrofurantoïne (FT), sulfaméthoxazole-triméthoprime (SXT), du pulsotype et de la présence ou non de la BLSE CTX-M15 associée à la carbapénémase de type OXA-48.....	72
Tableau 18 : Détection de différents types de carbapénémases par différents systèmes automatisés.....	76
Tableau 19 : Concentrations et diamètres d'inhibition critiques pour des souches d'entérobactéries pour les carbapénèmes [CASFM 2012] avec l'ertapénème à prendre en compte comme meilleur marqueur de détection des carbapénémases de type OXA-48.....	81

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Jeudi 18 octobre 2012

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE**

présenté par : Claire CHASSAGNE

Sujet : Caractérisation phénotypique de souches d'entérobactéries  
produisant une oxacillinase-48 isolées lors d'une épidémie  
survenue au CHU de Nancy en 2009/2011

Jury :

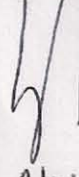
Président : M. Christophe GANTZER  
Directeur : M. Alain LOZNIOWSKI  
Juges : M. Tahar HADOU  
Mlle Hélène HOCHARD

Vu,

Nancy, le 4.09.2012

Le Président du Jury

Directeur de Thèse



Alain LOZNIOWSKI

Vu et approuvé,

Nancy, le 17.09.2012

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,



Vu,

Nancy, le - 1 OCT. 2012

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 5031

