

THÈSE

POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement
par

Julian WEITZ

Le 15 mai 2017

**« Exploration au laboratoire de la résistance aux carbapénèmes
chez *Enterobacter sp.* »**

Directeur de thèse : Dr. Laurent CAVALIÉ

JURY :

Monsieur le Professeur Éric OSWALD	Président
Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN	Assesseur
Monsieur le Professeur Pierre DELOBEL	Assesseur
Monsieur le Docteur Laurent CAVALIÉ	Assesseur
Monsieur le Docteur Damien DUBOIS	Assesseur
Monsieur le Docteur Michel JOMIER	Assesseur



THÈSE

POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement
par

Julian WEITZ

Le 15 mai 2017

**« Exploration au laboratoire de la résistance aux carbapénèmes
chez *Enterobacter sp.* »**

Directeur de thèse : Dr. Laurent CAVALIÉ

JURY :

Monsieur le Professeur Éric OSWALD	Président
Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN	Assesseur
Monsieur le Professeur Pierre DELOBEL	Assesseur
Monsieur le Docteur Laurent CAVALIÉ	Assesseur
Monsieur le Docteur Damien DUBOIS	Assesseur
Monsieur le Docteur Michel JOMIER	Assesseur

TABLEAU du PERSONNEL HU

des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier

au 1^{er} septembre 2016

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURS Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. ESCAT Jean		
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel		
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques		
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard		

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur SALVAYRE Bernard
Professeur MURAT	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur LOUVET P.	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	
Professeur CARATERO Claude	
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	
Professeur COSTAGLIOLA Michel	
Professeur ADER Jean-Louis	
Professeur LAZORTHES Yves	
Professeur LARENG Louis	
Professeur JOFFRE Francis	
Professeur BONEU Bernard	
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	
Professeur MAZIERES Bernard	
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	
Professeur SIMON Jacques	
Professeur FRAYSSE Bernard	
Professeur ARBUS Louis	

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis	Hépto-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophthalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLE Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STÓWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. LAFFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

M.C.U. - P.H.

M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAINAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
M. MONTOYA Richard	Physiologie
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry

M.C.U. - P.H

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel Médecine Générale
M. BISMUTH Serge Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve Médecine Générale
Mme ESCOURROU Brigitte Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves
Dr CHICOULAA Bruno
Dr IRI-DELAHAYE Motoko
Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre
Dr ANE Serge
Dr BIREBENT Jordan

Remerciements

Aux membres du jury :

A Monsieur le Professeur Éric Oswald, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Vos conseils (notamment linguistiques) m'ont été d'une immense aide tout au long de ce travail. Soyez assuré de mon respect et de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur Christine Roques-Ceschin, merci d'avoir accepté de juger mon travail et de me faire l'honneur d'être membre de ce jury. Vos qualités humaines et professionnelles m'ont beaucoup touché.

A Monsieur le Professeur Pierre Delobel, merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Merci pour votre disponibilité, vos conseils précieux, votre amabilité. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Damien Dubois, je te remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. Merci pour la bienveillance et la compétence avec laquelle tu m'as accompagné pendant ce travail et tout au long de mon internat.

A Monsieur le Docteur Laurent Cavalié, merci d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse. Votre disponibilité, votre amabilité et votre compétence sont remarquables. J'ai énormément appris pendant ces deux années de recherche, tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Merci beaucoup.

A Monsieur le Docteur Michel Jomier, merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Ta compétence, ta bienveillance m'ont impressionné. Quel plaisir d'avoir pu apprendre à tes côtés pendant ces six mois de stage passés à Millau. Je suis très heureux de bientôt pouvoir rejoindre toute l'équipe du CH de Millau. Merci pour tout.

A toutes celles et tous ceux qui ont participé à ce travail :

Je remercie particulièrement Mlle Amélie Goubin, pour la réalisation de la grande partie des tests en biologie moléculaire. Je te souhaite le meilleur pour ton avenir personnel et professionnel.

Merci beaucoup à Monsieur Florian Baquer, pour son aide dans la détermination des concentrations intrinsèques. Bonne continuation !

Je remercie également Mlle Pauline Puyo, pour la réalisation de concentrations intrinsèques et d'une part importante des tests de PCR. Ton amabilité et ta compétence sont remarquables !

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'Hygiène (Sabine Vaupré, Sylvie Daudé, Alain Gély et Mélanie Yegre) notamment pour la réalisation des ECP. Promis, ça aura été la dernière gélose CARBA... ! Merci pour votre patience et votre gentillesse.

Merci à l'équipe du laboratoire de Biologie moléculaire bactérienne (Serge Bey, Séverine Bouscatel, Céline Mouilhayrat et Solange Malacan). Votre aide bienveillante m'a beaucoup apporté. Encore merci.

Je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Bactériologie, pour tous les enseignements transmis au fil de ces trois stages, votre amabilité, votre disponibilité, et l'aide apportée tout au long de ce travail. Particulièrement merci à Pascale Clerc et Clara Hebert, sans qui les isolements et la préparation de géloses seraient restés un secret pour moi !

A ma famille, amis et collègues :

Un immense merci à toute ma famille, sans laquelle je ne serais pas là. Les mots ne sont pas capables d'exprimer tout ce que je vous dois.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagné pendant ce long cursus, qui m'ont tant apporté, autant sur le plan personnel que professionnel.

A l'équipe du CH de Millau, les 6 mois de stage passés parmi vous ont été tellement formateurs et agréables. Merci à Monsieur Garrigues, à Roch, à Michel, à Hélène et à vous tous ! A très bientôt pour de nouvelles aventures !

Enfin merci à mes co-internes passés et actuels, pour cette période passée à travailler ensemble, les joies du repas de midi, les discussions, les séances de piano, le foot du lundi... : Carole, Jérôme, Youssef, Sanaa, Claire, Noémie, Thomas, Julien, Camille, Louis-Thomas, Alice-Anne, Shérazade, Romain, Anthony, Cédric, Yohann, Laurie, Louisa, Thomas, Christophe, Agnès, Jules, Tiphaine, Céline, Etienne, Hélène, Hadrien, Mehdi, Samuel, Camille, Nico, Alix, et tous ceux que j'oublie... !!

Table des matières

Table des abréviations	12
Table des tableaux et des figures	14
1. Introduction	15
1.1. Généralités	15
1.2. Entérobactéries Productrices de Carbapénémases (EPC)	16
1.3. Souches d' <i>Enterobacter sp.</i> résistantes aux carbapénèmes.....	17
1.4. Autres mécanismes responsables de résistance aux carbapénèmes chez <i>Enterobacter sp.</i>	19
1.5. Problématiques de l'étude.....	20
2. Matériel et Méthodes	21
2.1. Tests de détection des carbapénémases au laboratoire	21
2.2. Souches bactériennes utilisées dans notre étude.....	22
2.3. Analyse moléculaire par PCR.....	23
2.4. Electrophorèse en champ pulsé (ECP)	23
2.5. Géloses sélectives.....	23
2.6. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	24
2.7. Algorithme de criblage des carbapénémases (EUCAST-CASFM 2015).....	25
2.8. Souches contrôles.....	25
2.9. Estimation de la proportion de souches NS à l'ertapénème par diffusion	26
2.10. Exploration des mécanismes d'efflux	26
2.11. Analyse statistique.....	27
3. Résultats	28
3.1. Souches bactériennes	28
3.2. Analyse par PCR.....	30
3.3. Electrophorèse en champ pulsé	30
3.4. Géloses sélectives.....	32
3.5. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	32

3.5.1. Carbapénèmes : CMI Vitek® / diamètres d'inhibition par diffusion	32
3.5.2. Carbapénèmes : diamètres d'inhibition par diffusion sur MH / sur MH-CLX	33
3.5.3. Faropénème (MAST CAT-ID®)	35
3.5.4. Témocilline.....	35
3.5.5. Algorithme de criblage des carbapénémases (EUCAST-CASFM 2015)	36
3.5.6. Influence de l'espèce d' <i>Enterobacter</i>	37
3.5.7. Proportion de souches NS à l'ertapénème par diffusion estimée sur la période d'étude	37
3.5.8. Spécificité et sensibilité des différents tests	38
3.6. Exploration des mécanismes d'efflux	40
3.6.1. PAβN	40
3.6.2. CCCP	41
3.6.3. Souches contrôles	43
4. Discussion	44
4.1. Proportion de résistances aux carbapénèmes et de carbapénémases.....	44
4.2. Performance des différents tests pour l'identification de carbapénémases	47
4.2.1. Non-sensibilité aux carbapénèmes	47
4.2.2. Géloses sélectives	49
4.2.3. Faropénème (MAST CAT-ID®)	50
4.2.4. Témocilline et algorithmes de criblage des carbapénémases.....	51
4.3. Exploration des mécanismes d'efflux	53
5. Conclusion	56
6. Références bibliographiques	58
7. Annexes	66
7.1. Annexe 1 : Amorces utilisées pour la recherche de carbapénémase par PCR	66
7.2. Annexe 2 : Images positives ou difficilement interprétables observées pour les disques de faropénème	67

7.3. Annexe 3 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition du faropénème et les différents carbapénèmes.....	68
7.4. Annexe 4 : Résultats des contrôles et des 18 souches positives avec l'algorithme de criblage des carbapénémases (CASFM 2015)	69
7.5. Annexe 5 : Isolats avec pousse non confluyente sur gélose supplémentée avec CCCP (20 µg/mL).....	70
7.6. Annexe 6 : Image particulière « en cocarde » pour le contrôle avec une carbapénémase VIM.....	71

Table des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
BHRe	Bactérie Hautement Résistante émergente
BLSE	β -Lactamase à Spectre Etendu
C-	Contrôle négatif
C+	Contrôle positif
C3G	Céphalosporine de Troisième Génération
CASFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CCCP	Carbonyl-Cyanide-3-Chlorophenylhydrazone
CHN	Céphalosporinase de Haut Niveau
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNR	Centre National de Référence
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide
EA	<i>Enterobacter aerogenes</i>
EC	<i>Enterobacter cloacae</i>
ECP	Electrophorèse en Champ Pulsé
EPC	Entérobactérie Productrice de Carbapénémase
ERT	Ertapénème
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	Céfépime
FP	Faux Positif
FQ	Fluoroquinolones
IMI	Imipénème
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry
MCO	Médecine-Chirurgie-Obstétrique
MER	Méropénème
MH	Mueller-Hinton
MH-CLX	Mueller-Hinton supplémentée de Cloxacilline
MHT	Modified Hodge Test

NA	Non applicable
NR	Non renseigné
NS	Non-sensible
Ø	Diamètre d'inhibition
OMP	Outer Membrane Porin
PAβN	Phényl-Arginine-β-Naphtylamide
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLP	Protéines de Liaison aux Pénicillines
Réa	Service de Réanimation
Réf.	Référence
RND	Resistance Nodulation Division
RTqPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S	Sensible
Se	Sensibilité
SI	Service de Soins Intensifs
Sp	Spécificité
TCC	Ticarcilline-Clavulanate
TEM	Témocilline
UFC	Unité Formant Colonie
VN	Vrai Négatif

Table des tableaux et des figures

Tableau I - Epidémiologie des principales carbapénémases.....	15
Tableau II - Comparaison des caractéristiques cliniques de 30 isolats NS à l'ertapénème / 30 isolats S à l'ertapénème	30
Tableau III - Caractéristiques microbiologiques et cliniques de 2 souches épidémiologiquement reliées.....	31
Tableau IV - Caractéristiques microbiologiques des isolats poussant sur gélose sélective.	32
Tableau V- Résultats sur gélose MH supplémentée de 2000 mg/L de cloxacilline	34
Tableau VI - Résultats des contrôles positifs et négatif.....	34
Tableau VII - Comparaison des résultats en fonction de l'espèce d' <i>Enterobacter</i>	37
Tableau VIII - Estimation de la proportion de souches NS à l'ertapénème par diffusion sur la période d'étude.....	38
Tableau IX - Résumé de la spécificité et de la sensibilité des tests évalués	39
Tableau X - Résultats des deux inhibiteurs de pompe d'efflux pour les souches contrôles	43
Tableau XI - Proportion de résistance aux carbapénèmes et de carbapénémases dans la littérature	46
Figure 1 - Schéma explicatif des mécanismes de production d'AmpC.....	18
Figure 2 - Algorithme de criblage des carbapénémases (CASFM 2015)	25
Figure 3 - Types de prélèvement dont sont isolées les souches incluses.....	29
Figure 4 - Types de service clinique où les prélèvements ont été recueillis.....	29
Figure 5 - Profils obtenus par ECP pour 12 souches ressemblantes	31
Figure 6 - Comparaison des CMI Vitek® aux diamètres d'inhibition par diffusion de l'ertapénème pour les 76 isolats inclus.....	33
Figure 7 - Microcolonies dans la zone d'inhibition de la témocilline	36
Figure 8 - Histogramme de la fréquence des effets observés du PaβN (40 µg/mL)	40
Figure 9 - Effets du PAβN (40 µg/mL) en fonction de la sensibilité à l'ertapénème (par diffusion)	41
Figure 10 - Histogramme de la fréquence des effets observés du CCCP (20 µg/mL).....	42
Figure 11 - Effets du CCCP (20 µg/mL) en fonction de la sensibilité à l'ertapénème (par diffusion)	43
Figure 12 - Diagramme de flux de l'étude.....	44
Figure 13 - Consignes d'interprétation données par le fabricant MAST-Diagnostics pour les disques CAT-ID®	50

1. Introduction

1.1. Généralités

Les carbapénèmes sont la classe d'antibiotiques la plus puissante parmi les β -lactamines. La première molécule découverte a été la thienamycine en 1976 à partir d'une bactérie à Gram positif, *Streptomyces cattleya*. Des dérivés ont été obtenus par synthèse : imipénème, méropénème, ertapénème et doripénème principalement.

Comme toutes les β -lactamines, ils agissent en se liant aux Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP), en inhibant les réactions de transpeptidation nécessaires au maintien de la structure de la paroi bactérienne. La traversée de la membrane externe pour accéder au peptidoglycane composant la paroi est facilitée chez les bactéries à Gram négatif par des porines, aussi appelés OMP (Outer Membrane Porin).

Les carbapénèmes ont un spectre d'activité très large, autant sur les bactéries à Gram positif, que les bactéries à Gram négatif. Ils ont une stabilité importante face à la plupart des β -lactamases. Cependant, il existe des β -lactamases capables d'hydrolyser les carbapénèmes, ainsi que les autres β -lactamines. Ces carbapénémases se répartissent selon la classification moléculaire d'Ambler parmi les classe A (sérine β -lactamase), classe B (métallo-enzymes nécessitant un ion bivalent), et classe D (OXA sérine β -lactamase).

Les carbapénémases les plus importantes, les régions les plus endémiques et le profil de résistance antibiotique associé sont récapitulés dans le tableau I :

Tableau I - Epidémiologie des principales carbapénémases (1)

Classification d'Ambler	Type	Epidémiologie	Profil de résistance
A: sérine β -lactamase	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	Amérique du Nord Europe: Grèce /Italie Israël Chine	Résistance à toutes les β -lactamines
B: métallo-enzymes	- New-Delhi-métallo- β -lactamase (NDM) - IMP carbapenemase (IMP) - Verona integron-encoded métallo- β -lactamase (VIM)	Asie Grèce	Résistance à toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam
D: OXA sérine β -lactamase	OXA-48-like carbapenemase (OXA-48)	Pays méditerranéens (Turquie) Moyen-Orient	Faible hydrolyse des pénicillines et carbapénèmes Céphalosporines non hydrolysées

En France, les carbapénémases les plus rencontrées chez les Enterobacteriaceae sont de type OXA-48-like, et parfois de type NDM. Elles représentaient respectivement 85,6% et 8,5% des isolats reçus par le Centre National de Référence (CNR) de Résistance aux Antibiotiques entre 2012 et 2014. Parmi les Entérobactéries Productrices de Carbapénémases (EPC) du genre *Enterobacter*, 82,1% étaient porteurs d'une enzyme de type OXA-48-like tandis que respectivement 4,9% et 7,3% produisaient une carbapénémase de type NDM ou VIM (2). Un lien épidémiologique avec des voyages en Afrique du Nord (Maroc) ou le Moyen-Orient était fréquent pour les patients porteurs de souches OXA-48-like, alors que des voyages dans le sous-continent Indien (parfois l'Afrique du Nord ou le Moyen-Orient) étaient associés aux enzymes de type NDM. Les isolats de type VIM étaient fréquemment retrouvés pour des patients en relation avec le Moyen-Orient (2,3).

1.2. Entérobactéries Productrices de Carbapénémases (EPC)

Les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae jouent un rôle majeur dans les infections communautaires et nosocomiales. Une identification précise et rapide des souches productrices de carbapénémases est d'importance primordiale pour plusieurs raisons :

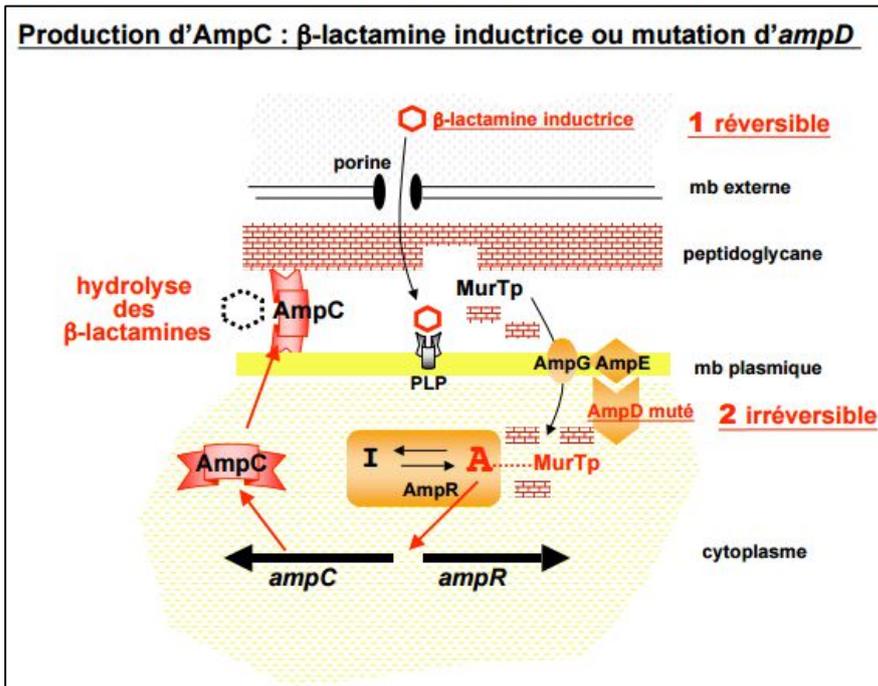
- Ces enzymes étant majoritairement codées par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides), elles sont capables de disséminer horizontalement à travers les espèces. Les EPC sont classées parmi les Bactéries Hautement Résistantes Emergentes (BHRE) et leur dépistage chez un sujet hospitalisé entraîne des mesures drastiques d'hygiène, de dépistage des sujets contacts, et d'organisation du personnel de soin. La prise en charge sera d'autant plus simple que la détection et les mesures seront précoces (4).
- Les souches d'EPC sont fréquemment, en dehors de la résistance aux β -lactamines, résistantes aux autres classes d'antibiotiques telles que les aminosides ou les quinolones. Les options thérapeutiques peuvent être très limitées : la colistine est parfois utilisée avec le problème de sa toxicité et l'apparition de résistances (5,6). La tigécycline, une glycylycine modifiée, atteint des concentrations plasmatiques insuffisantes pour traiter les bactériémies, et une mortalité accrue et l'apparition de résistances ont été décrites. La fosfomycine reste parfois sensible (S) et peut être utilisée pour les infections urinaires (7). Des combinaisons d'un carbapénème (même

si résistant in vitro) avec une de ces molécules ont trouvé un effet synergique pour certaines (8), et même une bithérapie avec deux carbapénèmes a montré une efficacité in vitro (9) et en clinique (10). Peu de nouvelles molécules sont en développement : parmi le ceftolozane-tazobactam et le ceftazidime-avibactam, uniquement le dernier est actif contre les EPC (de classe A) (11).

- Ces souches peuvent être plus virulentes (12). Une morbidité et mortalité accrues ont été retrouvées associées à une infection par les EPC (13,14). En contraste, une résistance aux carbapénèmes due à d'autres mécanismes tels qu'une perte de porines (associée à une céphalosporinase de haut niveau ou une BLSE) s'accompagne fréquemment d'une diminution de capacité de réplication (15).

1.3. Souches d'*Enterobacter sp.* résistantes aux carbapénèmes

Enterobacter cloacae et *Enterobacter aerogenes* sont les deux pathogènes majeurs à l'intérieur du genre *Enterobacter*. Ce sont des bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies facultatifs non sporulants, pathogènes opportunistes surtout impliqués dans des infections nosocomiales chez des patients fragilisés (16) : principalement bactériémies, infections respiratoires et urinaires (17). Ils sont naturellement résistants à l'amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, céphalosporines de première et deuxième génération à cause d'une céphalosporinase chromosomique. Lors d'un traitement par des céphalosporines de troisième génération (C3G), la sélection de mutants spontanés au niveau d'*ampD* qui surexpriment cette enzyme conduit à une résistance aux C3G (18–20) (figure 1). Le céfépime reste actif mais l'association fréquente avec une BLSE compromet le plus souvent son efficacité (21).



<http://www.microbes-edu.org/mecanisme/conference/verdet2.pdf>

Figure 1 - Schéma explicatif des mécanismes de production d'AmpC

La résistance aux carbapénèmes est un phénomène rencontré assez fréquemment chez *Enterobacter sp.*, même s'il n'existe pas de programme de surveillance systématique de la fréquence de cette résistance en Europe pour ce genre (22). Robert et al. ont conduit en 2012 une étude prospective nationale en France qui a retrouvé 0,6% de souches non-sensibles (NS) aux carbapénèmes parmi toutes les entérobactéries non répétitives incluses. 0,4% d'*Enterobacter cloacae* et 0,06% d'*Enterobacter aerogenes* NS aux carbapénèmes étaient retrouvés, ce qui représentait respectivement 8,2% de tous les *E. cloacae* et 4,0% de tous les *E. aerogenes*. Aucune de ces souches NS ne produisait une carbapénémase (23). Le mécanisme généralement retrouvé pour ces souches est l'association d'une imperméabilité (par perte de porines) et d'une céphalosporinase déréprimée (aussi appelée céphalosporinase de haut niveau (CHN)) chromosomique ou d'une BLSE (3). Des céphalosporinases plasmidiques telles que CMY et DHA ont été décrites chez *Enterobacter sp.* (24,25). Elles peuvent aussi causer une résistance aux carbapénèmes en s'associant à une imperméabilité.

1.4. Autres mécanismes responsables de résistance aux carbapénèmes chez *Enterobacter sp.*

La modification de la cible n'intervient pas dans la résistance aux carbapénèmes des Enterobacteriaceae (26).

Par contre, une expression diminuée des porines au niveau de la membrane externe peut jouer un rôle important dans la résistance aux carbapénèmes, surtout lorsqu'elle s'associe à d'autres mécanismes. Chez *E. cloacae* l'association d'une altération des porines OmpF et OmpC à une céphalosporinase dérégulée a été trouvée liée à une résistance à l'ertapénème, tandis que la sensibilité au méropénème et à l'imipénème était généralement conservée. Des mutations chromosomiques au niveau des gènes codant ces porines ainsi que leurs promoteurs étaient impliquées (19). Chez *E. aerogenes*, la diminution de l'expression des porines OmpK35 et OmpK36 est associée à la résistance aux carbapénèmes (27).

Par ailleurs, les mécanismes d'efflux sont largement impliqués dans la multi-résistance chez les Enterobacteriaceae. Ces pompes ubiquitaires amplifient les autres mécanismes de résistance présents, favorisent l'acquisition de nouvelles résistances (en exposant les germes à des concentrations d'antibiotique sub-inhibitrices), et participent à la virulence des bactéries. Ils constituent donc une cible thérapeutique intéressante. De localisation chromosomique le plus souvent, de plus en plus de gènes codant ces pompes d'efflux ont été identifiés aussi sur des plasmides (28,29). *Enterobacter* exprime notamment un système d'efflux tripartite AcrAB-TolC (appartenant à la famille RND) homologue à celui extensivement décrit chez *E. coli*. Il a été retrouvé impliqué dans la résistance en particulier aux macrolides et aux quinolones (30), mais son rôle dans la résistance aux carbapénèmes chez *Enterobacter sp.* n'a pas été clairement montré. Szabó et al. ont trouvé une diminution des CMI de l'ertapénème en utilisant l'inhibiteur de pompe d'efflux phényl-argininine- β -naphtylamide (PA β N) à 40 μ g/mL sur une souche d'*E. cloacae* porteuse de BLSE et d'une altération des porines. Néanmoins, le niveau d'expression d'AcrB n'était pas augmenté (31). En contraste, Jacoby (32) et Doumith (33) n'ont pas trouvé d'effet significatif sur la résistance à l'ertapénème du même inhibiteur de pompe d'efflux respectivement à 80 μ g/mL chez *K. pneumoniae* et à 100 μ g/mL chez *Enterobacter sp.* Le PA β N a été décrit comme un inhibiteur compétitif qui se fixerait dans la poche de liaison de l'antibiotique au niveau de la pompe d'efflux (34). Une autre

molécule fréquemment utilisée est le carbonyl-cyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP), qui est un agent découplant de la phosphorylation oxydative. Il abolit le gradient de protons au niveau membranaire nécessaire au fonctionnement des pompes d'efflux et n'est donc pas un inhibiteur spécifique (35).

1.5. Problématiques de l'étude

Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer la proportion de résistance aux carbapénèmes et celle des carbapénémases parmi les souches du genre *Enterobacter* isolées au CHU de Toulouse pendant une période d'un an.

Au sein de cette population, nous nous sommes intéressés à la performance de différents tests de laboratoire pour une identification rapide, fiable et efficace des éventuelles souches productrices de carbapénémases.

Nous avons finalement voulu explorer l'implication d'éventuels mécanismes d'efflux dans la résistance aux carbapénèmes de ces isolats en utilisant deux inhibiteurs de pompe d'efflux, le PA β N et le CCCP.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Tests de détection des carbapénémases au laboratoire

Différents tests de laboratoire sont utiles à la détection des carbapénémases :

- Les tests phénotypiques présentent l'avantage d'être moins coûteux, faciles à mettre en œuvre et souvent déjà bien implanté dans la routine du laboratoire. Ils sont capables de détecter l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance. Cependant, ils ont une sensibilité et spécificité limitées, et peuvent donc soit ne pas identifier d'importants mécanismes soit induire des tests complémentaires inutiles et plus coûteux.
- Les tests génotypiques ont généralement une spécificité et sensibilité excellentes pour les mécanismes recherchés (36,37). Parfois ils peuvent être appliqués directement aux échantillons prélevés et donner ainsi des résultats extrêmement rapides (38). Néanmoins ils sont souvent coûteux ou nécessitent davantage de compétences techniques. Ils ne sont pas capables d'identifier l'émergence de nouvelles enzymes. Ainsi leur utilisation en dépistage est limitée.

Ces tests peuvent être divisés en tests de dépistage (peu coûteux, intégration facile dans la routine du laboratoire et sensibilité élevée) suivis en cas de positivité par des tests de confirmation (spécificité élevée) :

- Tests de dépistage :
 - CMI de différents antibiotiques obtenues par antibiogramme automatisé utilisant la culture en milieu liquide (Vitek®, MicroScan Walk-Away®, Phoenix™)
 - Diamètres des zones d'inhibition autour de disques d'antibiotiques diffusant sur milieu gélosé : carbapénèmes (ertapénème, méropénème, imipénème), éventuellement témocilline et faropénème
- Tests de confirmation :
 - Eventuellement confirmation de la CMI par epsilomètre
 - Tests des disques/epsilomètres combinés ou tests de synergie : mise en évidence de l'augmentation d'activité d'un carbapénème par l'ajout d'un inhibiteur spécifique de la carbapénémase

- Tests basés sur la détection de l'hydrolyse d'un carbapénème (avec ajout éventuel d'un inhibiteur) : spectrophotométrie, MALDI-TOF-MS (39), tests CarbaNP (40), BlueCarba (41), BYG Carba (42)
- Test de Hodge modifié (MHT), OXA-48 disk test (43): mise en évidence à l'aide d'une souche indicatrice de la dégradation d'un carbapénème par la carbapénémase
- Tests immuno-chromatographiques (44)
- Tests génotypiques : PCR classique ou en temps réel, micropuces à ADN (37)

2.2. Souches bactériennes utilisées dans notre étude

Cette étude rétrospective incluait toutes les souches récupérables, non répétitives, d'*Enterobacter sp.* NS à l'ertapénème isolées de spécimens cliniques de patients du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse de juillet 2015 à juillet 2016. Cet hôpital universitaire a environ 2986 lits et couvre approximativement une population de 1,5 millions de personnes.

Les isolats ont été identifiés en utilisant un système de spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI Biotyper microflex LT ; Bruker Daltonics, Billerica, MA) selon les instructions du fabricant. Il n'a pas été conduit d'identification d'espèce à l'intérieur d'*Enterobacter cloacae* complex.

La non-sensibilité à l'ertapénème a été déterminée grâce aux résultats de routine d'un système automatisé Vitek2® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) en utilisant les valeurs critiques du CASFM 2015, c'est-à-dire une CMI strictement supérieure à 0,5 mg/L.

Tous les tests ont été exécutés en utilisant des colonies bactériennes proches d'un disque d'ertapénème.

Pour des échantillons (tirés au sort) de 30 isolats parmi les 76 souches NS à l'ertapénème et 30 isolats S à l'ertapénème isolés pendant la même période, les caractéristiques cliniques des patients ont été comparées (infection nosocomiale ou communautaire, durée de séjour inférieure ou supérieure à 7 jours, et type de service). Une infection nosocomiale a été définie par la survenue d'une infection après plus de 48 heures d'hospitalisation, ou avec antécédent d'hospitalisation dans les 3 mois précédents.

2.3. Analyse moléculaire par PCR

Les isolats ont été testés par PCR à la recherche de la présence de gènes codant des carbapénémases en utilisant des méthodes multiplex décrites précédemment (36,45). A la suite d'une optimisation avec des souches contrôles porteuses des gènes blaGES, blaOXA-48, blaKPC, blaIMP, blaVIM et blaNDM, de légères modifications ont été apportées à la technique : l'extraction de l'ADN a été réalisée à partir d'une colonie prélevée sur gélose au sang (proche d'un disque d'ertapénème) dans un volume de 100 µL d'eau distillée. Ni chauffage ni centrifugation n'ont été effectués. Ensuite l'ADN total (2 µL) a été soumis à chaque PCR multiplex dans un mix de 50 µL comportant 5 µL de tampon PCR NH₄ 10x (pH 8.8 / 0.1% Tween 20 / 25 mM MgCl₂, Bioron®), 1 U de DFS-Taq DNA Polymerase (Bioron®), 200 µM de concentration de chaque désoxynucléotide triphosphate et une concentration variable d'amorces spécifiques (annexe 1). Pour les gènes blaVIM, blaIMP et blaKPC, l'amplification a été réalisée de la manière suivante : dénaturation initiale à 94°C pendant 10 min ; 30 cycles à 94°C pendant 40 s (dénaturation), 55°C pendant 40 s (hybridation) et 72°C pendant 1 min (élongation) ; et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 min. Pour les gènes blaGES et blaOXA-48, la température d'hybridation était de 57°C, pour blaNDM elle était de 52°C. Les amplicons ont été visualisés après migration à 100 V pendant environ 20 min dans un gel d'agarose à 2 % et révélation par le GelRed® (Biotium). Un marqueur de poids moléculaire (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder) a été utilisé. Des souches contrôles porteuses des gènes de carbapénémases recherchées ont été incorporées à chaque série.

Les résultats de cette recherche de gènes de carbapénémases ont été utilisés ensuite comme référence pour tous les calculs de spécificité et sensibilité.

2.4. Electrophorèse en champ pulsé (ECP)

Brièvement, le protocole comprenait une lyse bactérienne par lysozyme et protéinase K, une digestion par XbaI pendant 20h à 37°C et une migration sur un appareil CHEF-DR® III (Bio-Rad) selon le programme ENB (soit 17h à 14°C sous un voltage de 6V/cm avec un angle de 120° et un switch de 2 à 17 s).

2.5. Géloses sélectives

Des géloses chromID® OXA-48 et chromID® CARBA (bioMérieux) ont étéensemencées avec un inoculum de 0,5 McFarland à partir d'une subculture âgée de 18 à 24 heures.

Après 18-24 h d'incubation à 35°C, toute colonie présente a été identifiée par le spectromètre MALDI-TOF.

2.6. Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de sensibilité aux antibiotiques disponibles ont été récupérés à partir des résultats de routine effectués par le système automatisé Vitek®.

Des sensibilités supplémentaires ont été déterminées rétrospectivement en utilisant les souches congelées à -20°C repiquées sur gélose au sang. En appliquant la méthode par diffusion décrite dans le CASFM 2015, les diamètres d'inhibition autour des disques ont été lus sur gélose Mueller-Hinton (MH).

La présence de BLSE et de CHN a été récupérée à partir des tests effectués en routine pour toutes les souches. Une synergie d'une ou plusieurs C3G avec l'acide clavulanique était indicatrice de BLSE, tandis qu'une augmentation d'au moins 5 mm du diamètre des C3G sur gélose MH supplémentée de cloxacilline à 200 mg/L (MH-CLX) était interprétée comme présence d'une CHN.

La CMI de l'ertapénème a été déterminée de manière manuelle pour 6 souches montrant une discordance majeure entre la CMI automatisée du Vitek® et les diamètres d'inhibition sur milieu gélosé. La méthode de macro-dilution en milieu liquide a été appliquée telle que décrite dans les recommandations 2012 du CLSI (46) : des concentrations d'ertapénème de 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 et 8 mg/L ont été testées. Un inoculum de chaque souche d'approximativement 5×10^5 UFC/mL a été utilisé.

Des disques d'ertapénème, de méropénème, d'imipénème (tous 10 µg) et de témocilline (30 µg) ont été testés sur gélose MH et gélose MH-CLX (200 mg/L).

De plus, des disques d'ertapénème ont été testés sur gélose MH supplémentée de 2000 mg/L de cloxacilline (concentration utilisée habituellement pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa*) pour les isolats qui n'étaient pas clairement S à l'ertapénème sur gélose MH-CLX (200 mg/L). La CMI intrinsèque de la cloxacilline (méthode par macro-dilution en milieu liquide) a été déterminée pour 2 isolats qui ne poussaient pas de manière confluyente sur cette gélose à forte concentration.

Des disques CAT-ID® (MAST Diagnostics Ltd, Bootle, Merseyside, UK), contenant 10 µg de faropénème, ont été testés selon les instructions du fabricant.

2.7. Algorithme de criblage des carbapénémases (EUCAST-CASFM 2015)

Les diamètres d'inhibition du ticarcilline/clavulanate (75/10 µg) et du céfépime (30 µg) ont été déterminés de manière additionnelle sur gélose MH. L'algorithme de criblage des carbapénémases du CASFM 2015 (figure 2) a ensuite été appliqué à toutes les souches cliniques et de contrôle.

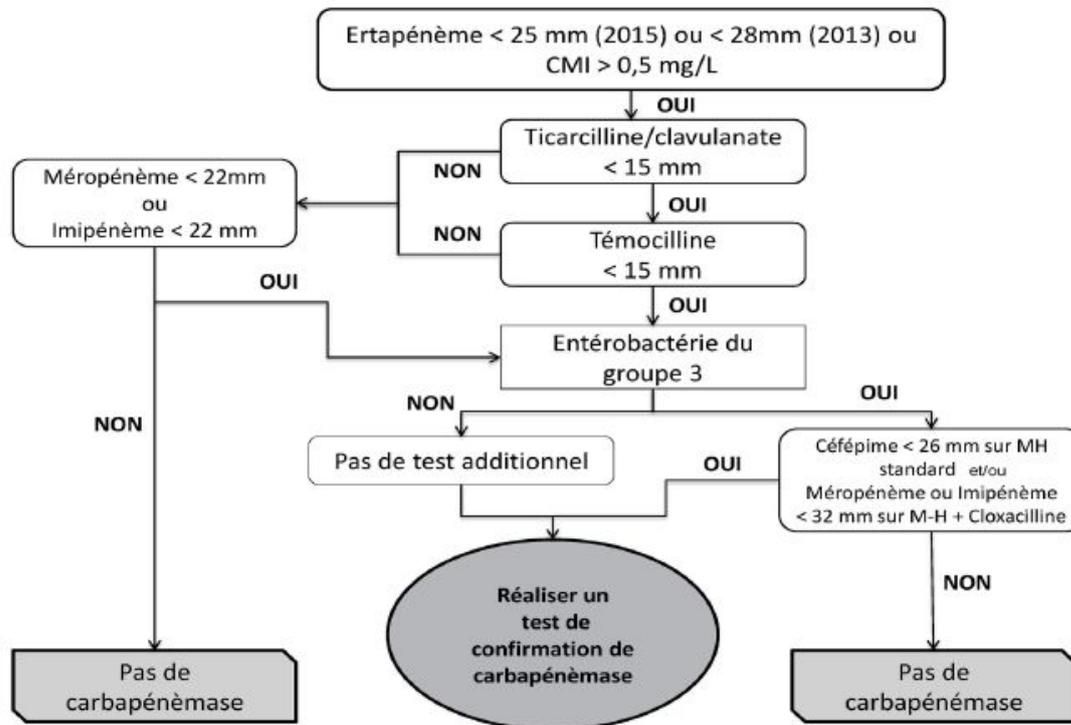


Figure 2 - Algorithme de criblage des carbapénémases (CASFM 2015) (47)

Le même algorithme a ensuite été légèrement modifié en utilisant des diamètres d'inhibition de la témocilline sur gélose MH-CLX (200 mg/L).

Les spécificités pour la détection des carbapénémases de l'algorithme et de sa version modifiée ont été calculées.

2.8. Souches contrôles

Une souche sauvage d'*Enterobacter cloacae* a été utilisée comme contrôle négatif.

Deux *Enterobacter cloacae*, l'un porteur d'une enzyme OXA-48 et l'autre d'une VIM ont été utilisés comme contrôle positif. Tous les deux étaient en plus porteurs d'une BLSE et d'une CHN.

2.9. Estimation de la proportion de souches NS à l'ertapénème par diffusion

La proportion de souches NS à l'ertapénème par diffusion parmi l'ensemble des souches isolées pendant la période d'étude a été estimée. Pour ceci, les proportions retrouvées sur l'échantillon finalement testé par diffusion ont été extrapolés à l'ensemble des souches initialement incluses (testées par l'automate Vitek®).

2.10. Exploration des mécanismes d'efflux

Les inhibiteurs de pompe d'efflux PA β N (40 μ g/mL) et CCCP (20 μ g/mL) ont été incorporés dans une gélose MH, puis la méthode par diffusion (CASFM 2015) a été appliquée avec un disque d'ertapénème. Les diamètres d'inhibition de l'ertapénème sur gélose MH « pure » et gélose MH supplémentée d'inhibiteur ont été comparés et une différence d'au moins 4 mm a été considérée comme significative. Pour les souches affichant une double zone d'inhibition sur gélose supplémentée d'inhibiteur, le diamètre de la zone avec la plus grande différence par rapport à la gélose « pure » a été utilisé pour l'interprétation.

Afin d'évaluer la répétabilité, les diamètres de l'ertapénème sur gélose MH et sur gélose MH supplémentée de 40 μ g/mL de PA β N ont été déterminés en double pour 25 souches choisies de manière aléatoire.

Les activités intrinsèques du PA β N et du CCCP ont été testées en utilisant la méthode par macro-dilution en milieu liquide. Le PA β N a été dilué dans du sérum physiologique et le CCCP dans du dimethyl sulfoxide (DMSO). Afin d'éviter une interaction causée par le solvant, le DMSO a été employé avec une concentration finale inférieure à 1 % (48). Des concentrations finales de 0 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 μ g/mL de chaque inhibiteur ont été testées. Les activités intrinsèques du PA β N et du CCCP ont été déterminées pour le contrôle négatif (une souche d'*E. cloacae* sauvage) et pour l'isolat n°1 qui était très résistant à l'ertapénème (mais sans carbapénémase). L'activité intrinsèque du CCCP a été testée pour 8 autres souches qui ne poussaient pas de manière confluyente sur la gélose MH supplémentée de 20 μ g/mL de CCCP.

La souche sauvage d'*E. cloacae* a été utilisée comme contrôle négatif. Une souche de *P. aeruginosa* avec une surexpression d'AmpC, une altération de la porine OprD et une surproduction du système d'efflux MexAB-OprM (caractérisé par RT-qPCR) a été utilisée comme contrôle positif (en utilisant des disques de méropénème). Les deux *Enterobacter*

cloacae porteurs de carbapénémase (une enzyme OXA-48 et une VIM) ont aussi été testés.

2.11. Analyse statistique

Des tests non paramétriques ont été utilisés du fait des faibles effectifs : un test exact de Fisher pour la comparaison des proportions, un test U de Mann-Whitney bilatéral pour la comparaison des distributions (médianes). Le seuil de significativité retenu était 0,05.

3. Résultats

3.1. Souches bactériennes

Pendant la période de juillet 2015 à juillet 2016, 123 souches d'*Enterobacter sp.* non répétitives NS à l'ertapénème ont été retrouvées dans le Laboratoire de Microbiologie du CHU de Toulouse. 116 *Enterobacter cloacae* et 7 *Enterobacter aerogenes* NS à l'ertapénème (résultats du Vitek®) ont été identifiés, représentant respectivement 13,3% des 880 *E. cloacae* et 1,9% des 368 *E. aerogenes* isolés pendant la même période.

Parmi ces 123 souches, 76 (61%) ont finalement pu être récupérées et testées (70 *E. cloacae* et 6 *E. aerogenes*). Au sein des 47 souches non récupérables, 36 (76%) étaient des souches d'*Enterobacter* qui n'avaient pas été conservées présentant une CHN mais pas de BLSE, avec une sensibilité de l'ertapénème sur MH-CLX. Les souches restantes ne pouvaient pas être utilisées majoritairement à cause de problèmes de conservation.

L'intégralité de ces 76 souches cliniques était NS à au moins une des C3G (ceftazidime, ceftriaxone, céfotaxime). 9 (12%) étaient porteuses uniquement d'une BLSE, 44 (58%) uniquement d'une CHN, 22 (29%) avaient les deux mécanismes et 1 (1%) ne produisait ni BLSE ni CHN. 9 (11%) souches présentaient une sensibilité à l'aztréonam associée à une NS à l'ertapénème par méthode en diffusion.

Les souches incluses avaient été isolées le plus fréquemment au sein de prélèvements urinaires, respiratoires et sanguins chez des patients issus des services de soins de courte durée (Médecine, Chirurgie et Obstétrique) et de patients gravement malades (Réanimation/Soins Intensifs) (figures 3 et 4).

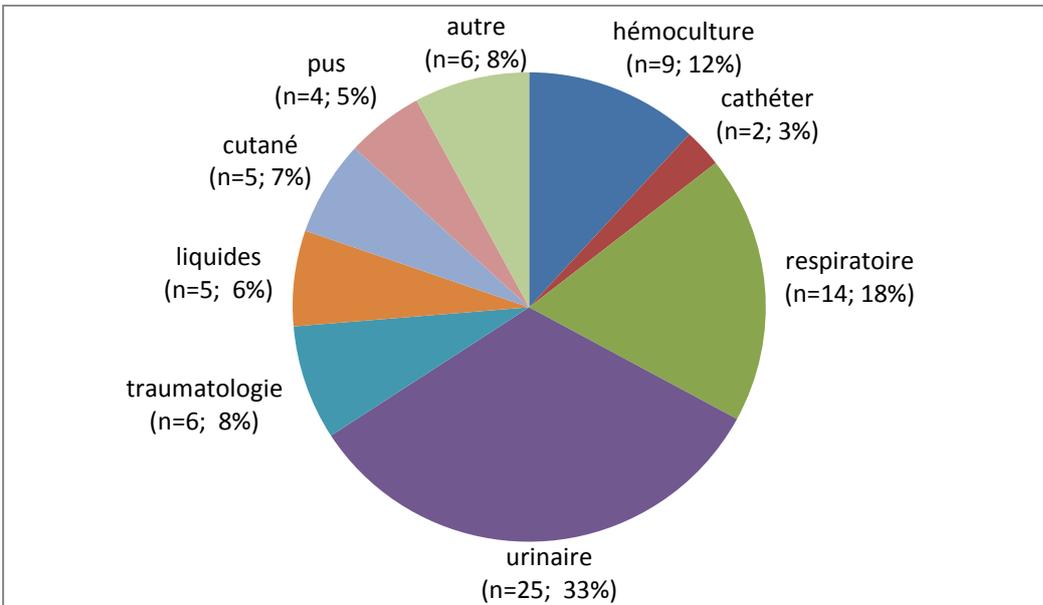
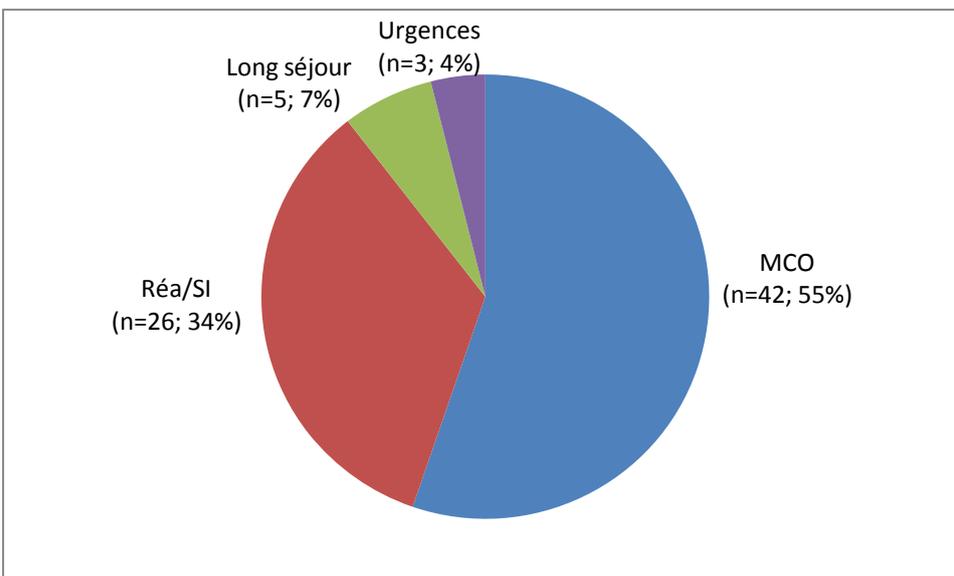


Figure 3 - Types de prélèvement dont sont isolées les souches incluses



MCO : Médecine-Chirurgie-Obstétrique ; Réa : Réanimation ; SI : Soins Intensifs

Figure 4 - Types de service clinique où les prélèvements ont été recueillis

On pouvait observer une proportion plus importante d'infections nosocomiales et de longs séjours parmi les isolats NS à l'ertapénème (tableau II).

Tableau II - Comparaison des caractéristiques cliniques de 30 isolats NS à l'ertapénème / 30 isolats S à l'ertapénème

	ertapénème NS	ertapénème S	p (test exact de Fisher)
Nosocomial	28	17	0,002
Communautaire	2	13	
Durée de séjour <7j	2	10	0,02
Durée de séjour >7j	28	20	
Réanimation/Soins intensifs	9	11	0,78
MCO	18	13	0,3
Long séjour	2	0	0,49
Urgences	1	6	0,1

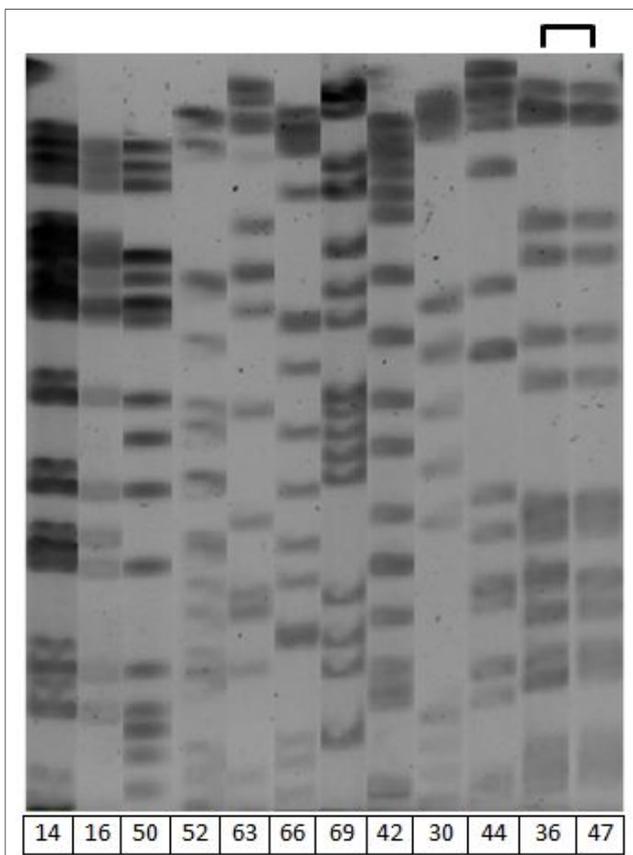
MCO : Médecine-Chirurgie-Obstétrique ; NS : non sensible ; S : sensible

3.2. Analyse par PCR

Parmi les 76 souches, aucun des gènes blaKPC, blaGES, blaVIM, blaIMP, blaNDM ou blaOXA-48 n'a été retrouvé.

3.3. Electrophorèse en champ pulsé

12 souches présentant des caractéristiques semblables au niveau clinique (patients dans un même service clinique pendant une période proche) ou microbiologique (antibiogrammes similaires) ont été examinés par ECP de leur ADN digéré par XbaI. Uniquement une paire d'isolats a montré un lien épidémiologique direct (figure 5). Les caractéristiques microbiologiques et cliniques de ces deux patients sont résumées dans le tableau III.



Les numéros correspondent aux numéros des différents isolats.
Les souches n° 36 et n° 47 montraient une similarité importante.

Figure 5 - Profils obtenus par ECP pour 12 souches ressemblantes

Tableau III - Caractéristiques microbiologiques et cliniques de 2 souches épidémiologiquement reliées

Souche n°	Profil de l'antibiogramme	Date d'isolement	Type d'infection	Service d'hospitalisation	Evolution
36 (<i>E. cloacae</i>)	R β-lactamines sauf MER et IMI R aminosides sauf amikacine R FQ	novembre 2015	Infection urinaire sur sonde chez patient de 90 ans	Chirurgie orthopédique	Décès (multiples comorbidités)
47 (<i>E. cloacae</i>)	R β-lactamines sauf MER et IMI R aminosides sauf amikacine R FQ	février 2016	Infection de prothèse de genou chez patiente de 70 ans	Chirurgie orthopédique (depuis 3 mois)	Guérison avec douleurs résiduelles

R : résistant ; MER : méropénème ; IMI : imipénème ; FQ : fluoroquinolones

On observe que les deux patients ont été hospitalisés au même moment (novembre 2015) en chirurgie orthopédique, l'infection sur prothèse s'exprimant de façon différée 3 mois plus tard. Les deux isolats présentaient exactement le même profil au niveau de l'antibiogramme.

3.4. Géloses sélectives

Sur gélose chromID® OXA-48, aucune des 76 souches ne montrait de pousse bactérienne. La souche contrôle OXA-48 affichait une pousse confluyente, tandis que ni le contrôle VIM ni le contrôle négatif ne poussaient.

Sur gélose chromID® CARBA, 6 des 76 souches affichaient une pousse (identifiée comme *Enterobacter spp.*). Deux souches poussaient de manière confluyente, 3 souches avec environ 4 UFC et une souche avec seulement 1 UFC. Ces souches n'étaient pas particulièrement résistantes à l'ertapénème ni sur gélose MH ni sur gélose MH-CLX, comparé aux autres souches qui ne poussaient pas. Tous ces isolats étaient porteurs d'une BLSE. Ni le contrôle OXA-48 ni le contrôle négatif ne poussaient, alors que le contrôle VIM affichait une pousse confluyente (tableau IV).

Tableau IV - Caractéristiques microbiologiques des isolats poussant sur gélose sélective

Souche N°	OXA48 (UFC)	CARBA (UFC)	Ø ERT sur MH (mm)	CMI ERT Vitek® (mg/L)	Ø ERT sur MH-CLX (mm)	BLSE	CHN
29	0	>1000	20	2	30	O	O
48	0	>1000	28	1	32	O	N
35	0	4	22	4	30	O	O
36	0	4	15	>4	25	O	O
47	0	4	15	>4	25	O	O
26	0	1	17	2	21	O	N
C+ VIM	0	>1000	8	>32	12	O	O
C+ OXA-48	>1000	0	16	4	20	O	O

OXA48 : gélose chromID® OXA-48 ; CARBA : gélose chromID® CARBA ; UFC: Unités Formant Colonies; Ø : diamètre d'inhibition; CMI: concentration minimale inhibitrice; ERT : ertapénème ; MH-CLX : gélose MH supplémentée de cloxacilline (200 mg/L); O: oui ; N: non ; C+ : contrôle positif

3.5. Tests de sensibilité aux antibiotiques

3.5.1. Carbapénèmes : CMI Vitek® / diamètres d'inhibition par diffusion

Pour l'ertapénème, en comparant la CMI obtenue par le Vitek® aux diamètres d'inhibition sur gélose MH, 31/76 (41%) souches NS au Vitek® (30 *E. cloacae* et 1 *E. aerogenes*) présentaient des diamètres S par diffusion sur gélose. 19 parmi ces 31 souches avaient un diamètre d'inhibition entre 25 et 27 mm. L'unique souche qui n'avait ni BLSE ni CHN présentait un diamètre d'inhibition très grand (39 mm).

Pour les 6 souches les plus discordantes, les CMI obtenues par macro-dilution en milieu liquide montraient des résultats corrélés aux diamètres obtenus par diffusion sur gélose. 4/6 souches qui étaient classées NS par le Vitek® étaient S à la fois par diffusion et par macro-dilution en milieu liquide, 2/6 souches résistantes d'après les résultats du Vitek® étaient S par diffusion et intermédiaires selon la macro-dilution en milieu liquide (figure 6).

Pour le méropénème (et l'imipénème), les 3 (et 2) uniques souches NS par diffusion avaient des CMI au Vitek® généralement corrélées.

ertapénème Ø diff. (mm)	CMI Vitek® (mg/L)			
	1	2	4	>8
<16	0	0	0	3
16-18	0	3	4	1
19-21	0	1	8	0
22-24	4	9	12	0
25-27	5	8	6	0
28-30	3	1	1 (1)	1 (1)
31-33	2	0	0	0
≥33	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)

Ø diff.: diamètre ertapénème par diffusion sur gélose MH; CMI: concentration minimale inhibitrice.
 La taille des barres représente le nombre d'isolats.
 Valeurs entre parenthèses : CMI obtenues par macro-dilution en milieu liquide pour 6 isolats.
 Rouge : résistant ; Jaune : intermédiaire ; Vert : sensible

Figure 6 - Comparaison des CMI Vitek® aux diamètres d'inhibition par diffusion de l'ertapénème pour les 76 isolats inclus

3.5.2. Carbapénèmes : diamètres d'inhibition par diffusion sur MH / sur MH-CLX

Sur gélose MH, 45/76 (59%) souches d'*Enterobacter sp.* étaient NS à l'ertapénème par diffusion. Sur gélose MH-CLX à 200 mg/L, 43 parmi ces 45 souches devenaient S. 5 souches étaient NS à l'ertapénème sur MH et ne récupéraient pas un diamètre S ou avaient un diamètre limite (à 25 mm) sur MH-CLX à 200 mg/L. Le tableau V montre les résultats pour ces souches-là qui ont été testées sur gélose MH-CLX à 2000 mg/L :

Tableau V- Résultats sur gélose MH supplémentée de 2000 mg/L de cloxacilline

Souche n°	Mécanisme additionnel	Ø sur MH (mm)	Ø sur MH-CLX 200 mg/L (mm)	Ø sur MH-CLX 2000 mg/L (mm)	CMI intrinsèque cloxacilline (mg/L)
26	BLSE	17	21	22	NA
36	BLSE + CHN	15	25	29	NA
47	BLSE + CHN	15	25	28	NA
1	BLSE + CHN	7	20	Pousse insuffisante	4000
33	CHN	16	25	Pousse insuffisante	>4000

Ø : diamètre d'inhibition; MH-CLX : gélose MH supplémentée de cloxacilline ; NA : non applicable

2 isolats présentaient une pousse insuffisante (vérifiée à 2 reprises) pour pouvoir déterminer un diamètre d'inhibition (mais avec une CMI intrinsèque de la cloxacilline supérieure à la concentration de la gélose). Les souches porteuses d'une CHN (n° 36 et 47) récupéraient encore plus de diamètre avec de fortes concentrations de cloxacilline, alors que pour la souche n° 26, n'ayant pas de CHN, peu de modification était observée.

Les 31 souches S à l'ertapénème sur gélose MH étaient toutes S sur MH-CLX. Pour le méropénème et l'imipénème, 3 et 2 souches respectivement étaient NS sur MH et devenaient toutes S sur MH-CLX (200 mg/L).

Les résultats des contrôles positifs et négatifs sont résumés dans le tableau VI :

Tableau VI - Résultats des contrôles positifs et négatif

				Ø sur MH			Ø sur MH-CLX (200 mg/L)		
	BLSE	CHN	CMI ERT Vitek®	ERT	MER	IMI	ERT	MER	IMI
Contrôle VIM	O	O	>32	8	9	12	12	11	15
Contrôle OXA-48	O	O	4	16	21	24	20	24	26
Contrôle négatif	N	N	<0.5	38	37	34	50	50	50

Ø : diamètre d'inhibition; ERT : ertapénème ; MER : méropénème ; IMI : imipénème ; CMI : concentration minimale inhibitrice ; MH-CLX : gélose MH supplémentée de cloxacilline ; O : oui ; N : non
Rouge : résistant ; Jaune : intermédiaire ; Vert : sensible

Les deux contrôles positifs VIM et OXA-48 présentaient une résistance à l'ertapénème sur MH qui persistait sur MH-CLX. Pour le contrôle VIM, le méropénème et l'imipénème étaient résistants sur MH et MH-CLX. Par contre, le contrôle OXA-48 était intermédiaire

au méropénème et S à l'imipénème sur MH et totalement S pour les deux sur MH-CLX. Avec le Vitek®, la CMI de l'ertapénème du contrôle VIM était très élevée, tandis que celle du contrôle OXA-48 était résistante mais moins élevée.

Le contrôle négatif présentait des valeurs S pour tous les 3 antibiotiques sur les deux types de gélose.

3.5.3. Faropénème (MAST CAT-ID®)

Selon l'interprétation indiquée par le fabricant, 2 parmi les 76 souches avaient des résultats pour le faropénème indicateurs de production de KPC/MBL. 10 souches présentaient une double zone avec des microcolonies dispersées dans toute la zone d'inhibition et ont été interprétées comme indicateurs de production d'OXA-48. Pour 10 autres souches, l'interprétation était difficile à cause de microcolonies périphériques (situées en bordure de la zone d'inhibition mais pas proches du disque). A part 2 isolats, toutes les souches positives (sans zone d'inhibition, microcolonies sur toute la zone ou en périphérie) produisaient une CHN.

Le contrôle VIM montrait un résultat clairement positif pour une production de KPC/MBL sans aucune zone d'inhibition. Le contrôle négatif montrait une grande zone d'inhibition. Le contrôle OXA-48 affichait un résultat ambigu avec uniquement des microcolonies périphériques. Lors de la répétition de l'expérience, des microcolonies dispersées dans toute la zone d'inhibition étaient retrouvées (indicateur de production d'OXA-48).

L'annexe 2 montre les images observées pour les isolats positifs ou difficiles à interpréter.

On observait une corrélation entre le diamètre de la zone d'inhibition du faropénème et le diamètre de l'ertapénème (annexe 3).

3.5.4. Témocilline

6 isolats parmi les 76 avaient des diamètres d'inhibition de la témocilline <11 mm (diamètre critique pour le dépistage des OXA-48-like d'après les guidelines de l'EUCAST en 2013 (49)). Toutes ces souches sauf une avaient une CHN. 19 isolats avaient un diamètre <15 mm (diamètre critique utilisé dans l'algorithme de criblage des carbapénémases du CASFM/EUCAST 2015(47)), parmi lesquelles toutes les souches sauf 2 avaient une CHN. Les souches porteuses de CHN avaient un diamètre médian de la témocilline de 12 mm, qui était augmenté à 22 mm quand la témocilline était testée sur

gélose MH-CLX (200 mg/L). Les souches sans CHN mais avec une BLSE présentait un diamètre médian de 17 mm, qui était augmenté à 20 mm sur MH-CLX. Sur MH-CLX, les 6 isolats faux positifs (FP) sur gélose MH (diamètre de la témocilline <11 mm) devenaient de vrais négatifs (VN), tandis que parmi les 19 FP sur gélose MH (diamètre de la témocilline <15 mm) uniquement 2 restaient positifs.

Pour les deux contrôles positifs (VIM et OXA-48), la témocilline n'affichait aucun diamètre d'inhibition ni sur gélose MH ni sur gélose MH-CLX. Le contrôle négatif montrait un diamètre d'inhibition très grand (30 mm) qui était augmenté à 40 mm sur MH-CLX.

Pour 19 parmi les 76 souches, on retrouvait des microcolonies dispersées à l'intérieur de la zone d'inhibition de la témocilline, à la fois sur gélose MH et sur gélose MH-CLX (figure 7). Ces microcolonies n'ont pas été prises en compte pour la mesure des diamètres d'inhibition.



Figure 7 - Microcolonies dans la zone d'inhibition de la témocilline

3.5.5. Algorithme de criblage des carbapénémases (EUCAST-CASFM 2015)

En appliquant l'algorithme de criblage des carbapénémases de l'EUCAST-CASFM 2015 à l'ensemble des 76 souches, 18 souches avaient des résultats positifs (c'est-à-dire la nécessité de réaliser un test de confirmation de carbapénémase). Toutes ces souches sauf une avaient une CHN. Toutes les souches négatives étaient S au méropénème et à l'imipénème.

En utilisant le critère « témocilline <15 mm » sur gélose MH-CLX (200 mg/L) au lieu de la gélose MH « pure », 13 parmi les 18 isolats FP devenaient VN (toutes porteuses de CHN). Parmi les 5 souches FP restantes, 2 présentaient uniquement de faibles modifications de

diamètre sous l'action de la cloxacilline, et 3 étaient résistantes au méropénème et/ou à l'imipénème ainsi qu'au céfépime.

Les contrôles positifs (VIM et OXA-48) avaient tous les deux des résultats en faveur d'une suspicion de carbapénémase, tandis que le contrôle négatif avait un résultat négatif. Ceci restait inchangé en utilisant la témocilline sur gélose MH-CLX au lieu de la gélose MH « pure ».

Les résultats des 18 souches avec un résultat positif à l'algorithme ainsi que des contrôles peuvent être trouvés dans l'annexe 4.

3.5.6. Influence de l'espèce d'*Enterobacter*

Les souches d'*E. aerogenes* présentaient plus fréquemment des résultats positifs pour le test du faropénème : les deux seuls résultats FP indicateurs de KPC/MBL étaient pour des souches d'*E. aerogenes* et 4 parmi l'ensemble des 6 isolats d'*E. aerogenes* avaient un résultat non-négatif pour le test du faropénème (tableau VII).

Tableau VII - Comparaison des résultats en fonction de l'espèce d'*Enterobacter*

	Ertapénème NS en diffusion	BLSE	CHN	faropénème: P ou O	faropénème: Ø médian (mm)
<i>E. cloacae</i>	40/70 (57%)	30/70 (43%)	61/70 (87%)	8/70 (11%)	13
<i>E. aerogenes</i>	5/6 (83%)	1/6 (17%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	9
	(p=0,39)*	(p=0,23)*	(p=0,58)*	(p=0,004)*	(p=0,08) [#]

NS : non sensible ; P : indicateur de la production de KPC/MBL ; O : indicateur de la production d'OXA-48 ;
Ø : diamètre d'inhibition

*test exact de Fisher

[#] test U de Mann-Whitney bilatéral

3.5.7. Proportion de souches NS à l'ertapénème par diffusion estimée sur la période d'étude

La proportion estimée de souches NS à l'ertapénème parmi l'ensemble des souches d'*Enterobacter sp.* non répétitives isolées sur la période d'étude de juillet 2015 à juillet 2016 au CHU de Toulouse était de 72/1248 soit 5,8%. Le tableau VIII détaille le mode de calcul en fonction de l'espèce d'*Enterobacter*.

Tableau VIII - Estimation de la proportion de souches NS à l'ertapénème par diffusion sur la période d'étude

	Souches totales isolées sur la période d'étude	NS (Vitek®)	NS (diffusion) / souches testées (%)	NS (diffusion) estimée sur la période (% des souches totales)
<i>E. cloacae</i>	880	116	40/70 (57%)	66 (7,5%)
<i>E. aerogenes</i>	368	7	5/6 (83%)	6 (1,6%)

NS : non sensible

3.5.8. Spécificité et sensibilité des différents tests

Dans le tableau IX sont résumés l'ensemble des résultats concernant la spécificité et la sensibilité des différents tests évalués:

Tableau IX - Résumé de la spécificité et de la sensibilité des tests évalués

	VN (MH)	VN (MH-CLX)	FP (MH)	FP (MH-CLX)	Sp (MH)	Se (MH) ⁺	Sp (MH-CLX)	Se (MH-CLX) ⁺
Ertapénème en diffusion	31	74	45	2	40,8%	2/2 (100%)	97,4%	2/2 (100%)
Ertapénème par Vitek®	0	NA	76	NA	0,0%	2/2 (100%)	NA	NA
Méropénème en diffusion	73	76	3	0	96,1%	2/2 (100%)	100,0%	1/2 (50%)
Imipénème en diffusion	74	76	2	0	97,4%	1/2 (50%)	100,0%	1/2 (50%)
chromID® OXA-48	76	NA	0	NA	100,0%	1/1(100%)	NA	NA
chromID® CARBA	70	NA	6	NA	92,1%	1/2 (50%)	NA	NA
faropénème (μ=N)	KPC/MBL 74 OXA 66	NA	KPC/MBL 2 OXA 10	NA	KPC/MBL 97,4% OXA 86,8%	KPC/MBL 1/1 (100%) OXA 0/1 (0%) [*]	NA	NA
faropénème (μ=OXA)	KPC/MBL 74 OXA 56	NA	KPC/MBL 2 OXA 20	NA	KPC/MBL 97,4% OXA 73,7%	KPC/MBL 1/1 (100%) OXA 1/1 (100%)	NA	NA
Témocilline (<11 mm)	70	76	6	0	92,1%	2/2 (100%)	100,0%	2/2 (100%)
Témocilline (<15 mm)	57	74	19	2	75,0%	2/2(100%)	97,4%	2/2 (100%)
Algorithme (témocilline MH/MH-CLX) [#]	58	71 [#]	18	5 [#]	76,3%	2/2 (100%)	93,4% [#]	2/2 (100%) [#]

VN : Vrai Négatif ; FP : Faux Positif ; Sp : spécificité ; Se : sensibilité ; MH-CLX : gélose MH supplémentée de cloxacilline (200 mg/L) ; μ : souches présentant des microcolonies périphériques ; N : résultat négatif pour le test du faropénème ; KPC/MBL : résultat indicateur de KPC/MBL pour le test du faropénème ; OXA : résultat indicateur d'OXA-48 pour le test du faropénème ; NA : non applicable

^{*} résultat ambigu avec microcolonies périphériques, devenu clairement positif en faveur OXA lors de la répétition de l'expérience

[#] algorithme CASFM appliqué avec témocilline sur MH-cloxacilline (200 mg/L)

⁺ Sensibilité calculée parmi les 2 souches contrôles positifs VIM et OXA-48 (car absence de carbapénémases dans l'échantillon étudié)

3.6. Exploration des mécanismes d'efflux

3.6.1. PA β N

Exposés à une concentration de PA β N à 40 μ g/mL, 46 parmi les 76 isolats affichaient une double zone d'inhibition sur gélose MH supplémentée. Pour la plupart d'entre eux (29/46), comparée à la zone sur gélose « pure », l'une des zones d'inhibition montrait uniquement une faible différence (entre 1 et 3 mm), tandis que la deuxième avait une différence de diamètre significative (au moins 4 mm).

En utilisant le diamètre de la zone avec la plus grande différence par rapport à la gélose « pure », 16 parmi les 76 souches montraient une augmentation de diamètre d'au moins 4 mm. 34 isolats affichaient une diminution du diamètre de l'ertapénème d'au moins 4 mm suite à l'exposition au PA β N (dont 15 avec une diminution de 6 ou 7 mm) (figure 8).

Les 25 souches réalisées en double montraient des diamètres d'ertapénème reproductibles, y compris pour les doubles zones (variation maximale 1 mm).

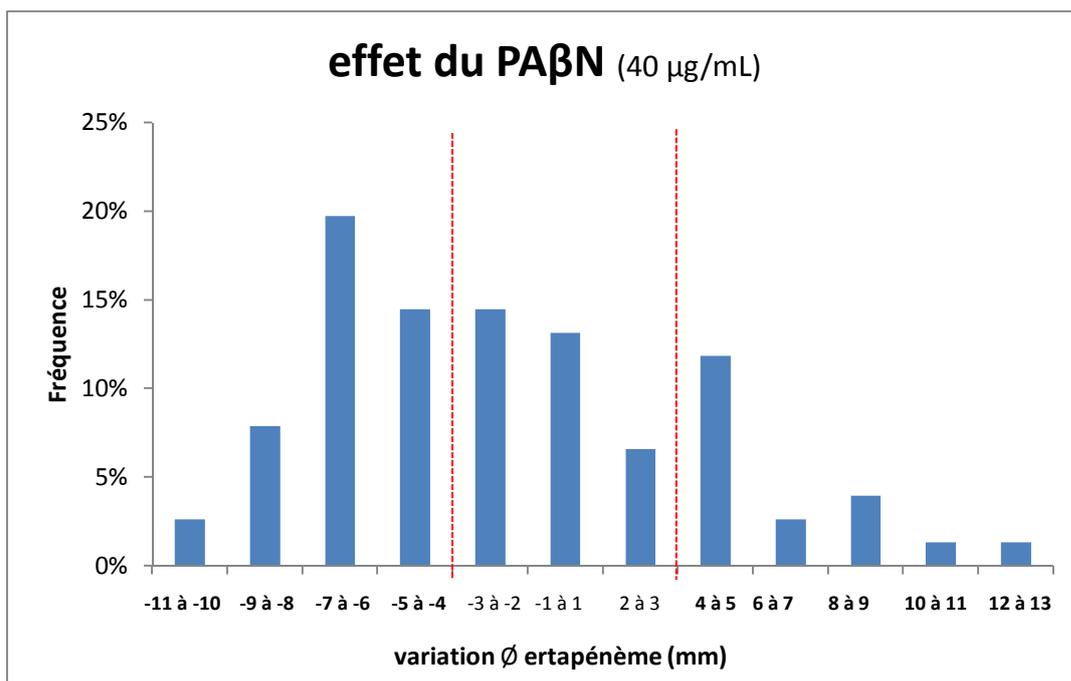


Figure 8 - Histogramme de la fréquence des effets observés du Pa β N (40 μ g/mL)

En évaluant la corrélation entre la résistance aux carbapénèmes (le diamètre d'inhibition de l'ertapénème par diffusion) et la différence de diamètre de l'ertapénème entre gélose non-supplémentée et gélose supplémentée (traduisant l'effet du PA β N), parmi les souches résistantes à l'ertapénème 10 montraient une augmentation significative (au

moins 4 mm) alors que 5 affichaient une diminution significative. Parmi les souches S à l'ertapénème (par diffusion), 19 souches montraient une diminution significative, tandis que 1 souche montrait une augmentation significative. Aucune des souches porteuses de BLSE sans CHN n'affichait une augmentation significative (figure 9).

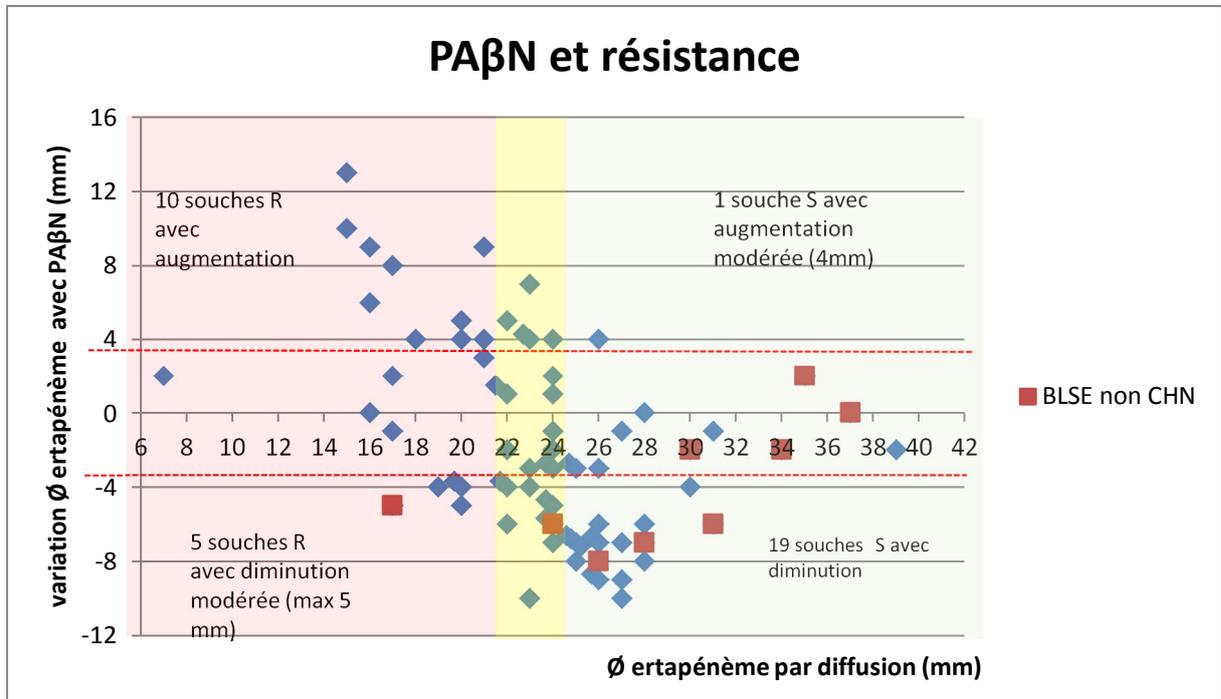


Figure 9 - Effets du PAβN (40 µg/mL) en fonction de la sensibilité à l'ertapénème (par diffusion)

Les CMI intrinsèques pour la souche contrôle négatif (*E. cloacae* sauvage) et la souche résistante n°1 étaient >100 µg/mL dans les deux cas.

Des tests préliminaires utilisant le PAβN à 10 µg/mL pour 14 souches choisies de manière aléatoire n'avaient montré aucune modification du diamètre d'ertapénème (dans une fourchette de +/- 1mm).

3.6.2. CCCP

Des géloses MH supplémentées avec 20 µg/mL de CCCP ont été utilisées. En contraste avec les résultats du PAβN, aucune double zone d'inhibition n'était observée avec le CCCP.

Pour 7 souches parmi les 76 ainsi que pour le contrôle négatif, la croissance n'était pas confluyente sur la gélose supplémentée de CCCP. La répétition de l'expérience montrait des résultats similaires. Les CMI intrinsèques du CCCP ont été déterminées pour ces 8

souches et elles étaient comprises entre 50 et 100 µg/mL. L'ensemencement de la gélose supplémentée de CCCP avec l'inoculum de la souche mais sans disque d'ertapénème montrait une croissance augmentée mais non confluyente pour 4 des 8 souches, pour les autres la croissance n'était pas modifiée. La souche n°34 ne poussait pas suffisamment sur gélose supplémentée pour déterminer une zone d'inhibition et a été exclue de l'analyse (annexe 5).

52 parmi les 75 souches finalement testées affichaient une augmentation du diamètre d'inhibition de l'ertapénème d'au moins 4 mm sur gélose MH supplémentée de 20 µg/mL de CCCP. 27 (36%) isolats montraient une augmentation de 4 ou 5 mm. Aucune des souches ne montrait une diminution de diamètre supérieure à 1 mm (figure 10).

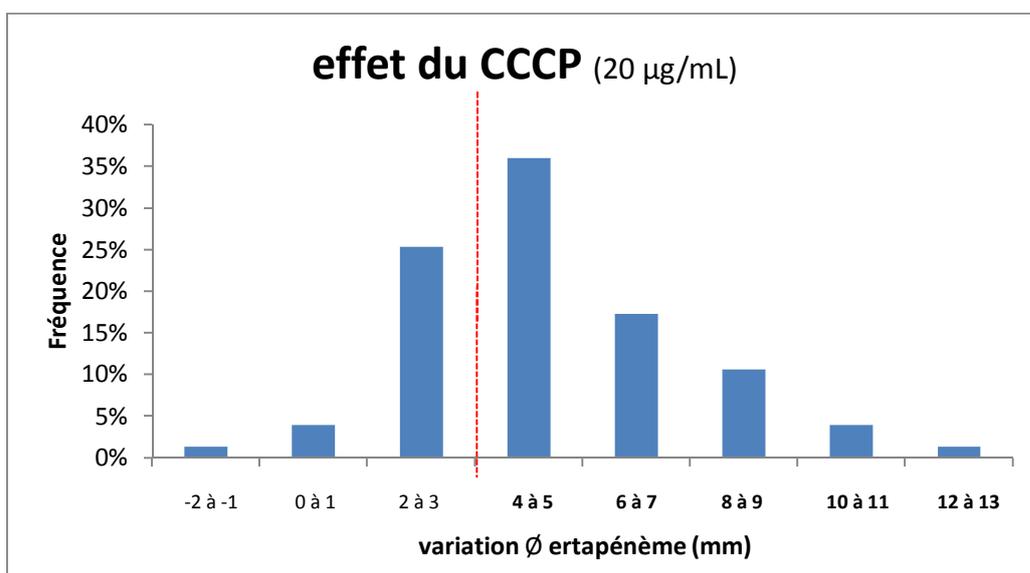


Figure 10 - Histogramme de la fréquence des effets observés du CCCP (20 µg/mL)

En évaluant la corrélation entre la résistance des isolats aux carbapénèmes (diamètre ertapénème en diffusion) et l'effet du CCCP (différence de diamètre de l'ertapénème entre gélose supplémentée et non supplémentée), aucune différence claire entre les souches résistantes et celles S à l'ertapénème n'était observée (figure 11).

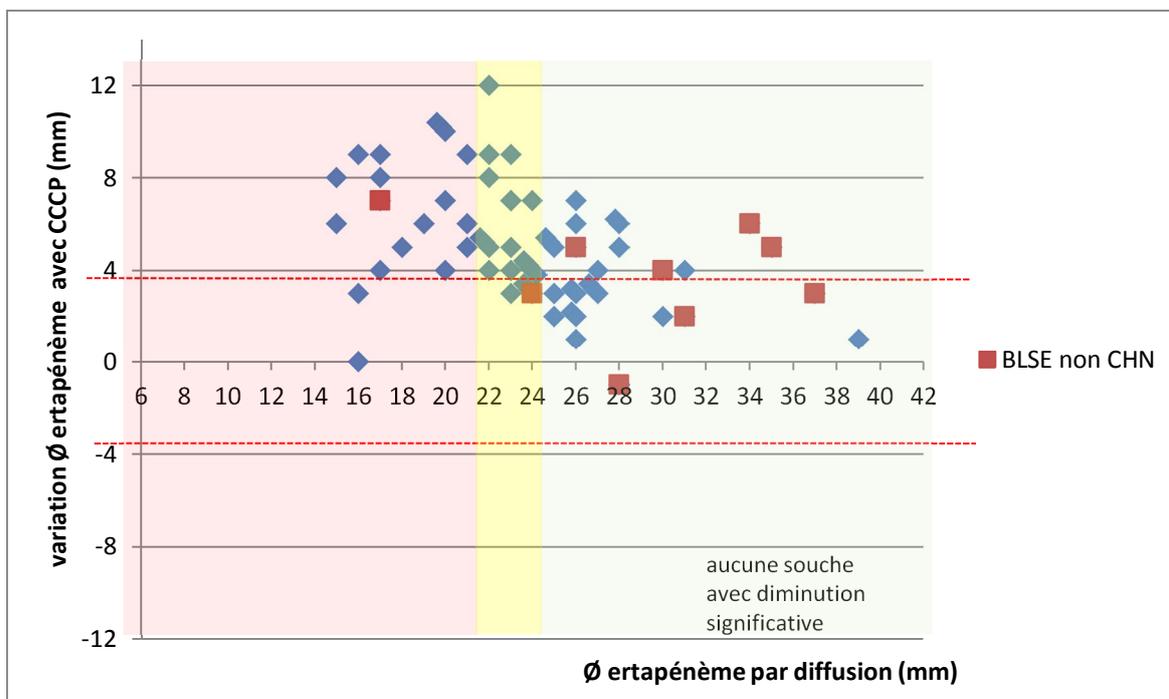


Figure 11 - Effets du CCCP (20 µg/mL) en fonction de la sensibilité à l'ertapénème (par diffusion)

3.6.3. Souches contrôles

Aucune modification de diamètre n'était observée pour le contrôle positif sur les géloses supplémentées, tandis que le contrôle négatif et les contrôles avec carbapénémases présentaient une augmentation de diamètre sur la gélose avec CCCP. Le contrôle OXA-48 affichait une diminution de diamètre sur gélose avec PAβN, alors qu'aucune modification de diamètre n'était retrouvée pour le contrôle avec VIM et le contrôle négatif (tableau X).

Tableau X - Résultats des deux inhibiteurs de pompe d'efflux pour les souches contrôles

	Espèce	Ø ertapénème [#] MH	Ø ertapénème [#] MH+PAβN	Ø ertapénème [#] MH+CCCP
Contrôle positif (MexAB-OprM)	<i>P. aeruginosa</i>	6	6	6
Contrôle (OXA-48)	<i>E. cloacae</i>	16	11	19
Contrôle (VIM)	<i>E. cloacae</i>	8	8	17 ⁺
Contrôle négatif	<i>E. cloacae</i>	38	38	43

MexAB-OprM : surexpression d'AmpC + altération de la porine OprD + surproduction du système d'efflux MexAB-OprM ; OXA-48 : carbapénémase OXA-48 + BLSE + CHN ; VIM : carbapénémase VIM + BLSE + CHN ; C. négatif : souche sauvage d'*E. cloacae*

MH : gélose MH ; MH+PAβN : gélose MH supplémentée de 40 µg/mL de PaβN ; MH+CCCP : gélose MH supplémentée de 20 µg/mL de CCCP

[#] le contrôle positif MexAB-OprM a été testé avec le méropénème au lieu de l'ertapénème (espèce naturellement résistante)

⁺ le contrôle VIM présentait une image „en cocarde“ particulière sur gélose avec CCCP et gélose avec cloxacilline (annexe 6)

4. Discussion

4.1. Proportion de résistances aux carbapénèmes et de carbapénémases

Dans notre étude, le critère d'inclusion de non-sensibilité à l'ertapénème était défini par les résultats du système automatisé Vitek®. Pour des raisons de coût, nous n'avons pas testé par E-test les isolats de notre étude, cependant, par diffusion uniquement 59% des souches testées initialement NS à l'ertapénème restaient NS. La détermination de CMI par macro-dilution en milieu liquide (méthode de référence) semble indiquer une surestimation de la résistance par le Vitek®. Par ailleurs, uniquement 61% des souches incluses ont pu être testées par diffusion (avec une surreprésentation possible de souches porteuses de BLSE). Nous avons extrapolé les proportions retrouvées sur cet échantillon à l'ensemble des souches incluses afin d'estimer la proportion d'*Enterobacter sp.* NS par diffusion à l'ertapénème pendant la période d'étude. La proportion de carbapénémases pourrait être sous-estimée à cause des souches qui n'ont pas pu être testées. Cependant, 36 des 47 souches non récupérables avaient un diamètre sensible de l'ertapénème sur gélose supplémentée de cloxacilline, en faveur de l'association d'une CHN avec une imperméabilité. Le risque de ne pas avoir identifié une carbapénémase est donc relativement faible.

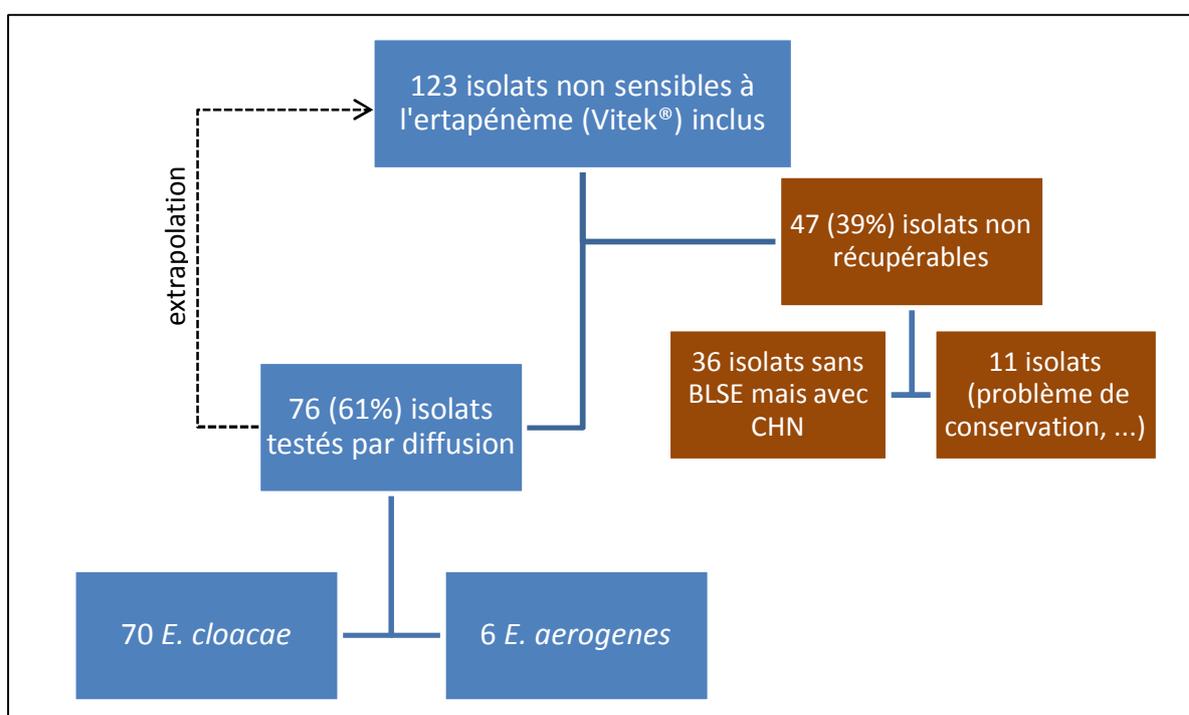


Figure 12 - Diagramme de flux de l'étude

Nous avons par ailleurs utilisé l'ertapénème comme unique critère d'inclusion, tandis que d'autres auteurs utilisent la non-sensibilité à au moins un carbapénème parmi ertapénème, imipénème, méropénème ou doripénème. Cependant, l'ertapénème étant la molécule la plus sensible à la fois pour la détection de carbapénémase et pour les autres mécanismes de résistance (50), il semble peu probable de ne pas avoir inclus une souche productrice de carbapénémase uniquement résistante à un autre carbapénème.

L'échantillon de 12 souches examinées par ECP parmi les 76 incluses comportait les isolats semblables au niveau clinique ou microbiologique. Nous pouvons donc considérer que les souches d'*Enterobacter sp.* incluses montraient une diversité génétique, avec uniquement 2 souches clonales.

La résistance à l'ertapénème était retrouvée plus fréquemment pour les infections nosocomiales et chez des patients hospitalisés pendant une longue durée. L'exposition aux germes hospitaliers et à de multiples antibiotiques chez ce type de patients plus gravement malades peut conduire à l'acquisition de souches productrices de BLSE ou de CHN, et donc à une résistance aux carbapénèmes en se combinant à une imperméabilité.

Nous avons trouvé une proportion estimée de 5,8% de souches NS à l'ertapénème parmi l'ensemble des *Enterobacter sp.* isolés sur une période de 1 an. L'étude nationale de Robert et al. portant sur la période 2011-2012 (23), avait montré une proportion semblable de 7,1% de NS aux carbapénèmes parmi tous les *Enterobacter sp.* identifiés ($p=0,08$). L'étude de Huang et al. sur la période février à avril 2012 (51), similaire à celle de Robert mais réalisée en Belgique, avait retrouvé une proportion d'*Enterobacter sp.* NS aux carbapénèmes beaucoup plus élevée (22,1%, $p<0,001$). La proportion de non-sensibilité parmi les *E. cloacae* (66/880 soit 7,5%) est nettement plus élevée que parmi les *E. aerogenes* (6/368 soit 1,6%) dans notre étude ($p<0,001$). Une différence significative entre ces deux espèces, bien que moins importante, pouvait déjà être retrouvée dans l'étude de Robert ($p<0,001$).

Le tableau XI résume les données de la littérature en les confrontant à nos résultats :

Tableau XI - Proportion de résistance aux carbapénèmes et de carbapénémases dans la littérature

		Belgique	France	Toulouse
		Huang (2012)	Robert (2012)	Cette étude (2016)
Proportion de:	parmi:	Diffusion	E-test	Diffusion (estimation)
<i>Enterobacter sp.</i> NS	<i>Enterobacter sp.</i> isolés	22,1%	7,1%	5,8%
	<i>E. cloacae</i> isolés	NR	8,2%	7,5%
	<i>E. aerogenes</i> isolés	NR	4,0%	1,6%
Carbapénémases	<i>Enterobacter sp.</i> NS	0/72	0/63	0/76

NS : NS aux carbapénèmes ; NR : non renseigné

Parmi toutes les souches NS à l'ertapénème, nous n'avons retrouvé aucune carbapénémase. Robert et Huang ont trouvé des résultats similaires. Pantel et al. avaient publié les résultats d'un programme régional de surveillance en Languedoc-Roussillon (France) de 2011 à 2013 (3) : parmi 87 *Enterobacter sp.* NS aux carbapénèmes une seule carbapénémase a été retrouvée (une OXA-48).

Alors que les autres espèces d'entérobactéries NS aux carbapénèmes présentent plus fréquemment une carbapénémase (surtout des OXA-48) (3,23,51), en France chez *Enterobacter sp.* d'autres mécanismes semblent presque toujours responsables (association d'une CHN ou BLSE à une imperméabilité). Dans notre étude, toutes les souches résistantes à l'ertapénème en diffusion exprimaient soit une BLSE soit une CHN (ou les deux). En Espagne, de 2006 à 2008, une étude a retrouvé 2 carbapénémases de type VIM parmi 12 *E. cloacae* NS aux carbapénèmes (52). Aux Etats-Unis, Ahn et al. ont rapporté 11 KPC parmi 44 isolats d'*Enterobacter sp.* entre 2009 et 2013 (53). Au Brésil 14 KPC parmi 111 souches d'*Enterobacter sp.* ont été retrouvées en 2011 (54). En contraste, en Chine, aucune carbapénémase n'a été identifiée au sein de 26 *Enterobacter sp.* collectés de 2012 à 2013 dans un hôpital universitaire (55). La proportion de carbapénémases parmi les isolats d'*Enterobacter sp.* NS aux carbapénèmes est donc fortement dépendante de l'épidémiologie locale.

Notre étude, bien que réalisée uniquement à un niveau local, suggère ainsi l'absence de progression des souches productrices de carbapénémases ainsi que des autres mécanismes responsables de la résistance aux carbapénèmes chez *Enterobacter sp.*

Dans notre étude, nous n'avons pas recherché les gènes de carbapénémases codant pour NMC-A et IMI. Ces carbapénémases, qui ont été décrites depuis 1990 chez des souches

d'*Enterobacter cloacae* complex (56), sont situées sur des éléments génétiques mobiles principalement intégrés au chromosome bactérien. Elles ont néanmoins une faible prévalence clinique, même si Boyd et al. ont retrouvé parmi 1110 isolats d'*Enterobacter* soumis à un laboratoire de référence canadien entre 2010 et 2015, 19 (1,7%) de souches productrices de NMC-A ou IMI (57,58).

4.2. Performance des différents tests pour l'identification de carbapénémases

Dans cette étude, nous avons évalué la performance de différents tests au sein d'un échantillon d'*Enterobacter sp.* NS à l'ertapénème caractérisés génotypiquement sans aucune carbapénémase. Ceci nous a permis de calculer la spécificité de ces tests, néanmoins le calcul de sensibilité était impossible à cause de l'absence de « vrais positifs ». Nous avons choisi d'utiliser deux souches contrôles porteuses respectivement d'une carbapénémase de type VIM et OXA-48, qui ne faisaient pas partie de l'échantillon initialement étudié. Ceci permet une approche, bien que très limitée du fait du très faible effectif, de la sensibilité de la technique utilisée.

4.2.1. Non-sensibilité aux carbapénèmes

Depuis 2011, l'EUCAST ainsi que le CLSI recommandent de se baser uniquement sur les résultats de CMI ou de diamètre pour la sensibilité aux carbapénèmes, qui sont rendus tels quels même en présence de carbapénémase. La recherche de carbapénémase ne serait indiquée que dans un but épidémiologique. Les valeurs critiques des carbapénèmes ont été diminuées, de manière à garantir une efficacité clinique de toute molécule catégorisée sensible. Puisqu'il n'y a pas d'antibiotique plus puissant parmi les β -lactamines et que parfois une thérapie à plus haute doses et/ou associant une autre molécule semble efficace (59), cette attitude peut être justifiée. Néanmoins, elle a été critiquée à cause du risque de perte de données épidémiologiques, du peu de données disponibles sur la relation entre CMI et succès thérapeutique et de la variabilité analytique des tests de routine (60–62). En tout cas, cela souligne l'importance de la fiabilité des tests de sensibilité aux carbapénèmes.

La méthode de référence pour la détermination de la sensibilité aux carbapénèmes est la dilution (macro- ou microdilution) en milieu liquide. Cependant cette technique est très chronophage et ne peut donc pas être utilisée en routine. Les méthodes automatisées

telles que le Vitek® ont montré des résultats parfois discordants avec la méthode de référence : en 2010, une ancienne carte montrait une tendance à la sous-estimation des CMI, ce qui était corrigé avec une nouvelle version (62). En contraste, Pailhoriès et al. ont trouvé en 2014 (63) une surestimation importante de la CMI par le Vitek® en comparaison avec celle obtenue par dilution en gélose et par E-test. 42% des souches catégorisées NS à l'ertapénème étaient S par les deux autres méthodes. Dans notre étude, nous observons des résultats comparables avec 41% de souches NS au Vitek® qui étaient S par diffusion. Pour des raisons pratiques, uniquement les souches les plus discordantes (6/76) ont pu être vérifiées par la méthode de macro-dilution. La réalisation de ce test sur l'intégralité des isolats pourrait être intéressante.

Dans notre étude, parmi les 3 carbapénèmes testés, l'ertapénème présentait la moins bonne spécificité (40,8%) pour la présence de carbapénémase. Le méropénème et l'imipénème étaient très spécifiques puisque seulement respectivement 3 et 2 FP étaient retrouvés. Par contre, la souche contrôle OXA-48 était S à l'imipénème. D'autres auteurs (64,65) ont trouvés des résultats similaires : l'ertapénème a la meilleure sensibilité mais une spécificité médiocre, tandis que le méropénème semble offrir le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité. L'imipénème serait déconseillé à cause d'un manque de sensibilité, ce qui semble conforté par notre résultat de sensibilité de la souche OXA-48. La mauvaise spécificité de l'ertapénème est due à sa sensibilité importante à des mécanismes autres que les carbapénémases : l'association d'une CHN ou d'une BLSE, qui l'hydrolysent faiblement, avec une concentration périplasmique diminuée de l'ertapénème à cause d'une altération des porines conduit à une résistance (31,55). Woodford et al. ont montré une réduction de 8 fois de la CMI de l'ertapénème par la cloxacilline chez *Enterobacter sp.* (66). Dans notre étude, la spécificité de l'ertapénème testée sur gélose MH supplémentée par 200 mg/L de cloxacilline était très élevée (97,4%), avec les deux souches contrôles qui restaient résistantes. Nous avons par ailleurs observé que parmi les souches plus résistantes à l'ertapénème sur gélose MH-CLX, une plus forte concentration de cloxacilline (2000 mg/L) aboutissait à une inhibition plus poussée de la CHN. Cependant, certaines souches présentaient une croissance insuffisante sur ce milieu, malgré une CMI intrinsèque retrouvée supérieure à la concentration de la gélose. Pour le méropénème et l'imipénème, la souche OXA-48 était S sur gélose MH-CLX (200 mg/L). Ainsi, nos résultats laissent penser que parmi les carbapénèmes,

l'ertapénème testée sur gélose MH-CLX présente les meilleures performances intrinsèques chez *Enterobacter sp.*

4.2.2. Géloses sélectives

Les géloses sélectives chromogènes chromID® CARBA et chromID® OXA-48 ont été développées pour l'identification respective des entérobactéries productrices de carbapénémases et celles productrices d'OXA-48 à partir d'écouvillonnages rectaux.

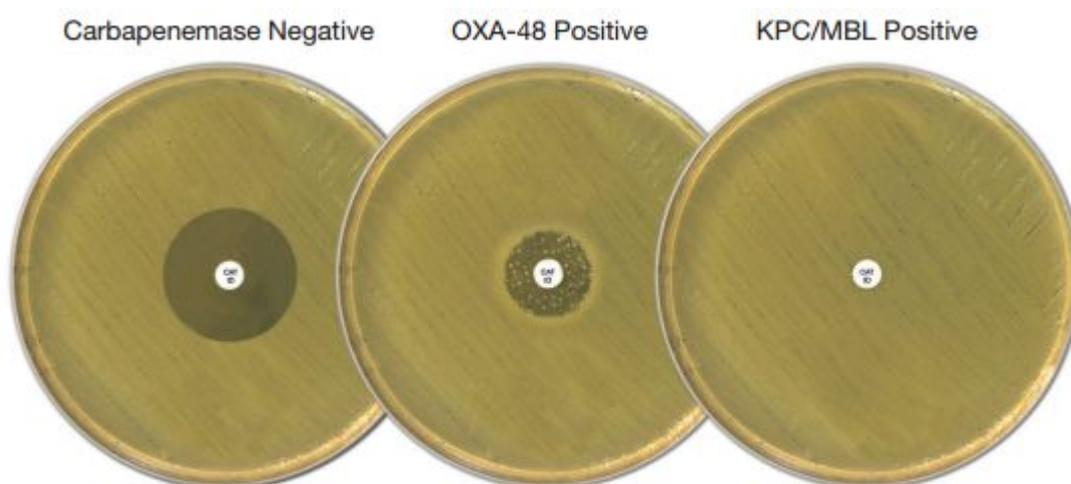
Pour chromID® CARBA, Vrioni et al. ont rapporté une sensibilité de 92,4% et une spécificité de 96,9% pour le dépistage des carbapénémases sur des écouvillonnages rectaux (67). Dans notre étude, nous avons retrouvé une spécificité de 92,1% pour une population d'*Enterobacter sp.* résistante aux carbapénèmes. L'ensemble des 6 souches FP comportaient une BLSE, alors que dans l'étude de Vrioni aucune des souches BLSE ne poussait sur gélose chromID® CARBA. Néanmoins, ce nombre de FP était faible. Simner et al. (68) ont appliqué une méthodologie similaire à la nôtre sur une population comportant des bacilles à Gram négatifs porteurs de carbapénémase ainsi que 45 souches non productrices de carbapénémase mais d'une CHN. Une spécificité de 42/45 (93,3%) a été retrouvée pour cette population porteuse de CHN, ce qui est comparable à la valeur trouvée dans notre étude. Le contrôle OXA-48 ne poussait pas sur notre gélose chromID® CARBA, ce qui est en accord avec la faible sensibilité décrite pour ce type de carbapénémase (68,69), par contre le contrôle VIM était positif.

Girlich et al. ont rapporté une sensibilité de 91% et une spécificité de 100% de la gélose chromID® OXA-48 pour la détection des OXA-48 (69). Nous trouvons des résultats similaires, avec aucun FP et une pousse correcte du contrôle OXA-48.

Nos résultats confirment la bonne spécificité de la gélose chromID® CARBA appliquée à une population d'*Enterobacter sp.* résistante aux carbapénèmes, chez qui cette résistance est majoritairement médiée par des mécanismes autres que les carbapénémases. Par contre, la détection des OXA-48, qui présentent fréquemment un faible profil de résistance, est difficile sur cette gélose. La gélose chromID® OXA-48 possède de bonnes performances intrinsèques pour les identifier.

4.2.3. Faropénème (MAST CAT-ID®)

Le faropénème medoxomil est un carbapénème oral, efficace dans le traitement des infections communautaires causées par des Enterobacteriaceae, incluant les souches avec une CHN ou une BLSE (70). Le fabricant MAST Diagnostics a commercialisé assez récemment les disques CAT-ID®, comportant 10 µg de faropénème. Ils permettraient une détection fiable, simple et rapide des carbapénémases de type KPC/MBL et OXA-48 : les souches porteuses de KPC ou MBL ne montreraient pas de zone d'inhibition autour du disque, tandis que les isolats producteurs d'OXA-48 afficheraient une double zone avec une zone claire comportant des microcolonies. Une zone d'inhibition clairement définie sans double zone serait indicatrice de l'absence de production de carbapénémase (figure 12).



<http://www.mastgrp.com/Identification%20strips%20discs%20and%20rings/Glossies/ZT157%20-%20CAT-ID%20V2.0.pdf>

Figure 13 - Consignes d'interprétation données par le fabricant MAST-Diagnostics pour les disques CAT-ID®

Day et al. ont trouvé sur une collection de 248 entérobactéries caractérisées génotypiquement que l'absence de zone d'inhibition autour d'un disque de faropénème à 10 µg était prédictif de la production de carbapénémase avec une sensibilité et spécificité respective de 99% et 94% (71). 12/13 isolats porteurs d'une OXA-48 et un isolat producteur de KPC montraient une zone d'inhibition comportant une zone avec de nombreuses microcolonies. Un seul isolat (une OXA-48) avait un résultat faussement négatif avec une zone claire d'inhibition sans microcolonies. 5 parmi les 82 souches non productrices de carbapénémase n'affichaient aucune zone d'inhibition, il s'agissait de

Klebsiella pneumoniae avec une BLSE ou une céphalosporinase plasmidique. Lorsque le test était appliqué à une collection « sauvage » (avec plus de souches atypiques), la spécificité était plus faible (87%) : au sein des 16 isolats FP (pas de zone d'inhibition), 10 associaient une CHN avec une altération de porines. Koroska et al. ont observé une faible sensibilité pour le dépistage des OXA-48 (48/84 isolats seulement identifiés), mais uniquement 1 FP en faveur d'OXA-48 parmi 41 souches sans carbapénémases (une souche productrice de CHN) (72).

Dans notre étude, la spécificité retrouvée pour la production de KPC/MBL (absence de zone d'inhibition) était bonne (97,4%). Par contre, 10 isolats sur les 76 avaient un résultat faussement indicateur d'OXA-48 (zone claire avec microcolonies poussant jusqu'au disque). 10 isolats supplémentaires étaient difficilement interprétables : la zone d'inhibition n'était pas clairement définie avec des microcolonies en périphérie, sans toutefois atteindre le disque. De plus, le contrôle OXA-48 montrait lors d'une première expérience un tel résultat (microcolonies périphériques), ce qui était corrigé lors de la répétition du test. Sauf 2 souches, toutes ces souches faussement positives, et notamment les souches ambiguës, étaient productrices d'une CHN. La présence de résultats positifs était plus fréquente chez les *E. aerogenes*.

Nos résultats suggèrent donc, en contraste avec les études d'autres auteurs, surtout un manque de spécificité pour l'identification des OXA-48 (73,7% en tenant compte des résultats ambigus), avec des difficultés d'interprétation pour un nombre important de souches.

4.2.4. Témocilline et algorithmes de criblage des carbapénémases

La détection des carbapénémases de classe A et B peut être effectuée en utilisant des disques combinés ou des tests de synergie avec un inhibiteur spécifique et un disque de carbapénème. Une synergie avec l'acide boronique (BA) et non la cloxacilline indique la production de carbapénémase de classe A, une synergie avec l'acide dipicolinique (DPA) ou l'EDTA celle d'une carbapénémase de classe B. Il n'y a pas d'inhibiteur décrit pour les carbapénémases de classe D (oxacillinasés). Il a été montré qu'un haut niveau de résistance à la témocilline suggère la production d'enzyme de type OXA-48-like. D'autres mécanismes peuvent aussi conférer une résistance à la témocilline : les carbapénémases de type MBL, les BLSE et les CHN associés à une altération de porines (les BLSE avec un diamètre restant généralement supérieur à 10 mm, les CHN ayant une distribution plus

variable (65)). Maurer et al. ont donc suggéré d'utiliser un cut-off <11 mm (recommandé dans les guidelines de l'EUCAST en 2013 (49)) en testant la témocilline sur gélose supplémentée de cloxacilline : la spécificité de la témocilline était augmentée sans perte de sensibilité (65). Van Dijk et al. ont testé 128 Enterobacteriaceae (dont 23 *Enterobacter*) et trouvé 100% de sensibilité et spécificité en utilisant un cut-off <11mm associé à l'absence de synergie avec le BA ou le DPA (73). L'étude de Robert et al. publiée en 2017 décrit les résultats à l'origine de l'algorithme de criblage des carbapénémases adopté par le CASFM en 2015 (74). Ils utilisent un cut-off <15 mm pour la témocilline puisqu'il affichait une plus grande sensibilité lors de son application à 349 Enterobacteriaceae NS à l'ertapénème (dont 135 *Enterobacter*). L'algorithme global affichait une sensibilité de 100% et une spécificité de 78,8%, tandis que l'application de l'algorithme de van Dijk (avec un cut-off <11mm pour la témocilline) n'avait que 55,8% de sensibilité et 90,6% de spécificité pour les isolats de cette étude. Il y a une discordance entre l'étude de van Dijk et celle de Robert pour le seuil permettant la détection des OXA-48. Cependant, uniquement 26,1% des isolats ont pu être testés par Robert pour l'algorithme de van Dijk, ce dernier utilisant la résistance au méropénème comme critère d'inclusion. Les souches OXA-48 étant souvent faiblement résistantes aux carbapénèmes et l'ertapénème souvent le carbapénème le plus touché (75), une explication possible pourrait être un biais de sélection dans l'étude de van Dijk : la population de l'étude de Robert (sélectionnée sur la résistance à l'ertapénème) comporterait des OXA-48 plus faiblement résistantes que la population de l'étude de van Dijk (sélectionnée sur la résistance au méropénème). L'étude de Dortet et al. retrouvait 4,9 % des producteurs d'OXA-48-like avec un diamètre de la témocilline entre 11 et 13 mm (76).

Dans notre étude, le contrôle OXA-48 présentait un diamètre d'inhibition de la témocilline de 6 mm sur gélose MH et MH-CLX. La spécificité était meilleure (92,1%) pour le cut-off <11 mm comparé à <15mm (75,0%). Sur gélose MH-CLX, la spécificité du cut-off <15 mm devenait aussi très satisfaisante (97,4%). Ceci s'accorde avec les résultats observés par Maurer (65).

L'application de l'algorithme développé par Robert et al. (74), qui est couramment utilisé en routine en France, montrait une spécificité de 76,3% parmi les souches d'*Enterobacter sp.* de notre étude. Nos résultats sont donc similaires à ceux de Robert

qui trouvait 78,8% de spécificité (parmi une population constituée néanmoins aussi d'autres entérobactéries).

L'originalité de notre approche a été de modifier légèrement cet algorithme en testant la témocilline sur gélose additionnée de cloxacilline, en s'appuyant sur l'étude de Maurer (65). Nous avons trouvé une augmentation de la spécificité de l'algorithme modifié à 93,4% grâce à cette stratégie. Les 2 souches contrôles (VIM et OXA-48) restaient positives.

L'utilisation de la témocilline (cut-off <15 mm) sur gélose additionnée de cloxacilline dans l'algorithme préconisé par le CASFM pourrait être une possibilité pertinente pour des souches porteuses de céphalosporinase (entérobactéries du groupe 3). Il serait intéressant de tester cette approche sur une population comportant davantage de souches porteuses de carbapénémases afin de confirmer l'absence de perte de sensibilité.

4.3. Exploration des mécanismes d'efflux

Dans la littérature, de multiples auteurs ont utilisé des inhibiteurs de pompe d'efflux afin d'évaluer leur implication dans la résistance aux antibiotiques. Cependant, des résultats souvent discordants sont retrouvés : chez *Enterobacter sp.*, Szabó et al. avaient identifié un effet du PA β N sur la résistance à l'ertapénème (31), alors que Doumith et al. n'avaient pas observé d'effet (33). Pour le CCCP, un effet semble être présent chez des germes non fermentants : Pournaras et al. l'ont testé à 2,55 μ g/mL sur 13 *P. aeruginosa* résistants au méropénème et ont observé une diminution de la CMI du méropénème (77). Kuo et al. ont trouvé un effet partiel sur les CMI de l'imipénème sur des souches d'*Acinetobacter baumannii* avec une multirésistance induite in vitro en utilisant le CCCP à une concentration de 1,25 μ g/mL, mais aucune synergie n'a été identifiée sur des souches cliniques multirésistantes (78). Chez les Enterobacteriaceae, Zhang et al. ont utilisé des concentrations plus élevées (10,2 μ g/mL) sur des isolats de *Klebsiella pneumoniae* producteurs de carbapénémase KPC-2, mais aucun effet sur les CMI des carbapénèmes n'a été observé (79). Shi et al. ont testé des souches de *K. pneumoniae* sans carbapénémase mais avec une céphalosporinase plasmidique associée à une perte de porines, aucune synergie avec le méropénème et l'imipénème n'a été mise en évidence (80). Jacoby et al. ont obtenu des souches de *K. pneumoniae* porteuses de diverses β -

lactamases et une altération des porines, mais 20,4 µg/mL de CCCP ne montrait pas d'effet sur la résistance à l'ertapénème (32). D'après ces données, il semblerait donc que le CCCP ait un certain effet chez les bactéries non fermentants, mais pas chez les entérobactéries, alors que les résultats du PAβN sont plus variables.

Dans notre étude, les résultats obtenus avec ces deux inhibiteurs étaient également difficilement interprétables. Pour le PAβN, des effets très variables étaient observés : 16/76 souches montraient une augmentation significative de diamètre, alors que 34/76 isolats présentaient une diminution significative de diamètre. De façon intéressante, on pouvait noter que la plupart des isolats dont le diamètre augmentait étaient résistants à l'ertapénème par diffusion, alors que la diminution était observée surtout pour les isolats S à l'ertapénème par diffusion. L'utilisation du PAβN a été critiquée car cette molécule semble perméabiliser les membranes bactériennes et aboutir à une fuite notamment de la céphalosporinase dans le milieu extérieur, et donc avoir des effets non spécifiques (81). Cet effet pourrait être du moins partiellement prévenu par l'ajout de Mg²⁺ dans le milieu de culture (82). L'augmentation du diamètre d'inhibition que nous avons observé pourrait être le témoin de la présence de pompes d'efflux inhibées par le PAβN, où d'effets non spécifiques tels qu'une fuite de la céphalosporinase. En effet, parmi les souches n'impliquant pas de CHN mais un autre mécanisme (BLSE sans CHN), aucune ne montrait d'augmentation significative de diamètre, ce qui pourrait plaider en faveur d'un effet de perméabilisation membranaire et de fuite de la CHN. Les nombreuses souches pour lesquelles à l'opposé une diminution de diamètre était observée, étaient pour la plupart S à l'ertapénème par diffusion, et n'auraient possiblement pas été incluses dans les autres études sur le PAβN n'incluant que les isolats résistants aux carbapénèmes en E-test (31,33). L'hypothèse d'une induction des pompes d'efflux par cet inhibiteur compétitif reste cependant possible.

Pour le CCCP, en contraste avec les données de la littérature chez les entérobactéries, nous avons observé sur une majeure partie des isolats (52/75) une augmentation significative de diamètre. Il a été montré que le CCCP inhibait le fonctionnement d'une protéine transmembranaire, AmpG, nécessaire à l'expression à haut niveau de la céphalosporinase chez *E. cloacae* (83,84). L'inhibition de la CHN pourrait expliquer l'effet que nous avons observé, néanmoins les souches BLSE sans CHN présentaient aussi une augmentation. Etant donné que le contrôle négatif affichait aussi une augmentation, alors

que paradoxalement, pour le contrôle positif aucune modification de diamètre n'était notée, d'autres effets non spécifiques semblent probablement impliqués.

La croissance non confluyente sur la gélose supplémentée de 20 µg/mL de CCCP observée pour quelques isolats paraît être liée à un effet combiné de cet inhibiteur et de l'ertapénème. En effet, de manière similaire aux résultats trouvés pour la cloxacilline à forte concentration (2000 mg/mL), la CMI intrinsèque de ces souches (déterminée par méthode de macro-dilution en milieu liquide) est nettement plus élevée que la concentration de la gélose. En tout cas, bien que les résultats fussent très répétables pour un même isolat, l'effet intrinsèque des inhibiteurs semblait variable suivant les souches. De plus, pour le PAβN, nous avons retrouvé de façon reproductible de très fréquentes doubles zones d'inhibition, suggérant un effet variable même au niveau des sous-populations d'un même isolat.

En somme, ces résultats ne permettent pas d'affirmer ou d'infirmer l'implication de pompes d'efflux dans la résistance aux carbapénèmes des souches d'*Enterobacter* évaluées. Des effets non spécifiques des deux inhibiteurs utilisés semblent être probables. Il n'existe actuellement aucun document de référence quant au choix approprié des inhibiteurs, des concentrations et des souches contrôles à employer (29), ce qui peut expliquer la multitude de résultats différents retrouvés dans la littérature. La technique de RT-qPCR permet de quantifier de façon beaucoup plus exacte et standardisable le niveau d'expression des gènes de pompes d'efflux, et est devenue maintenant beaucoup plus accessible (29,85). Les méthodes phénotypiques (avec inhibiteurs de pompes d'efflux) peuvent être utilisées en combinaison avec les méthodes génotypiques (86), cependant les inhibiteurs de pompes d'efflux semblent être peu performants dans l'identification correcte de ces mécanismes (K. Jeannot, CNR Résistance aux antibiotiques de Besançon, communication personnelle, 18 avril 2017).

5. Conclusion

Les souches du genre *Enterobacter* constituent une population particulière car elles sont porteuses d'une céphalosporinase chromosomique constitutive fréquemment surexprimée. De plus, l'acquisition d'une BLSE est un phénomène de plus en plus rencontré. En association avec une imperméabilité suite à une altération des porines, une résistance aux carbapénèmes peut apparaître, l'ertapénème étant la première molécule touchée. La présence de carbapénémase reste très rare (du moins en France) chez ces souches. Les tests de laboratoire doivent donc être capables d'éviter, surtout pour ce genre, d'inutiles suspicions de carbapénémases génératrices de tests complémentaires coûteux et de mesures drastiques au niveau clinique. C'est donc surtout une bonne spécificité des tests qui doit être recherchée, cependant la sensibilité doit aussi rester correcte pour ne pas méconnaître l'émergence de carbapénémases parmi ce type de souches en France.

Dans cette étude, tous les tests évalués nécessitent environ 1 jour de plus après l'obtention du résultat de non-sensibilité aux carbapénèmes par la méthode automatisée (Vitek®). Le test de l'ertapénème en diffusion sur gélose additionnée de cloxacilline montrait la meilleure spécificité parmi les carbapénèmes, tout en gardant une bonne sensibilité (notamment pour les OXA-48). L'utilisation de géloses sélectives (chromID® CARBA accompagnée de chromID® OXA-48) semble aussi très intéressante. Le faropénème montrait une spécificité moins bonne, avec des difficultés d'interprétation des résultats et de répétabilité, et une sensibilité pour les OXA-48 pouvant faire défaut. Une légère modification de l'algorithme de criblage des carbapénémases de l'EUCAST-CASFM 2015 pourrait avoir un intérêt pour les souches du genre *Enterobacter*. L'utilisation de la témocilline sur gélose additionnée de cloxacilline, avec un seuil de 15 mm, a permis une très bonne spécificité de cet algorithme sur les isolats de cette étude, avec une sensibilité pour le dépistage des OXA-48 conservée.

Nous avons observés dans cette étude que la méthode automatisée (Vitek®) semble surestimer de manière importante la résistance à l'ertapénème. Ceci peut avoir un impact sur les possibilités thérapeutiques chez un patient infecté par une telle souche d'*Enterobacter sp.*, la possibilité d'un traitement par céfépime étant compromise en cas de présence d'une BLSE.

D'autres tests de laboratoire existent que nous n'avons pas évalués. Le test de Hodge n'est actuellement plus recommandé à cause d'un manque de sensibilité et de spécificité (87). Certains auteurs ont proposé des versions modifiées avec notamment l'ajout de $ZnSO_4$ (88) ou de cloxacilline (89) dans le milieu afin d'améliorer respectivement sa sensibilité et sa spécificité. Les tests génotypiques présentent le problème de leur coût fréquemment élevé. Un nouveau test immuno-chromatographique (OKN K-SeT®) capable de détecter les carbapénèmes de type OXA-48, NDM et KPC, a été commercialisé récemment par Coris BioConcept. Une évaluation réalisée en France a retrouvé une sensibilité et une spécificité de 100% pour les 3 types de carbapénèmes recherchés (44). Ce test couvre deux des carbapénèmes les plus fréquentes en France (OXA-48 et NDM). Les VIM, qui sont aussi décrites chez *Enterobacter sp.* en France (2), ne sont pas détectées pour le moment. D'un coût plus faible que la plupart des méthodes génotypiques et de réalisation rapide (environ 15 minutes), ce test pourrait être très intéressant pour une identification rapide des carbapénèmes en cas de suspicion sur les résultats de l'antibiogramme automatisé.

Les inhibiteurs de pompe d'efflux que nous avons utilisés pour explorer l'implication de ce mécanisme dans la résistance aux carbapénèmes chez *Enterobacter sp.* n'ont pas donné de résultats facilement interprétables. Des modes d'action non spécifiques ont probablement été à l'origine de la plupart des effets observés, et une comparaison avec une méthode plus fiable telle que la RT-qPCR serait pertinente.

Toulouse, le 27.04.2017

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine Purpan
D.CARRIE


26/04/2017

Professeur Eric OSWALD
Chef de Service
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
Institut Fédératif de Biologie
330 av. de Grande Bretagne / TSA 40031
31059 TOULOUSE CEDEX 9

6. Références bibliographiques

1. Duin D van, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 11 août 2016;0(0):1-10.
2. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 9 févr 2017 [cité 6 avr 2017];22(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316908/>
3. Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, Marchandin H, Sotto A, Lavigne J-P, et al. French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. déc 2014;33(12):2285-92.
4. HCSP. Prévention de la transmission croisée des « Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes » (BHRé) [Internet]. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2013 juill [cité 6 avr 2017]. Disponible sur: <http://hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=372>
5. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. juin 2016;22(6):1038-43.
6. van Duin D, Doi Y. Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Are We at the End of the Road? *J Clin Microbiol*. oct 2015;53(10):3116-7.
7. van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. févr 2013;75(2):115-20.
8. Perez F, Chakhtoura NGE, Papp-Wallace K, Wilson BM, Bonomo RA. Treatment Options for Infections Caused by Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Can We Apply « Precision Medicine » to Antimicrobial Chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother*. avr 2016;17(6):761.
9. Bulik CC, Nicolau DP. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2011;55(6):3002-4.
10. Giamarellou H, Galani L, Baziaka F, Karaiskos I. Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2013;57(5):2388-90.
11. van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Infect Dis*. 15 juill 2016;63(2):234-41.
12. Pereira RS, Dias VC, Ferreira-Machado AB, Resende JA, Bastos AN, Andrade Bastos LQ, et al. Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in

- Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Infect Dev Ctries*. 30 juin 2016;10(6):592-9.
13. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A, Cafiso V, et al. Infections with VIM-1 metallo- β -lactamase-producing enterobacter cloacae and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol*. nov 2009;47(11):3514-9.
 14. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2008;52(4):1413-8.
 15. Lavigne J-P, Sotto A, Nicolas-Chanoine M-H, Bouziges N, Bourg G, Davin-Regli A, et al. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. juin 2012;18(6):539-45.
 16. Zhao Q, Jia X, Pang F, Li Y. [Study on genotype and clinical characteristics of infection of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae*]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. oct 2015;95(40):3264-8.
 17. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*. juill 2012;7(7):887-902.
 18. Ehrhardt AF, Sanders CC. β -Lactam resistance amongst *Enterobacter* species. *J Antimicrob Chemother*. nov 1993;32 Suppl B:1-11.
 19. Babouee Flury B, Ellington MJ, Hopkins KL, Turton JF, Doumith M, Loy R, et al. Association of Novel Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms in *ampD* with Cephalosporin Resistance and Phylogenetic Variations in *ampC*, *ampR*, *ompF*, and *ompC* in *Enterobacter cloacae* Isolates That Are Highly Resistant to Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2016;60(4):2383-90.
 20. Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol*. 2015;6:392.
 21. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. janv 2009;22(1):161-182, Table of Contents.
 22. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [Internet]. [cité 7 avr 2017]. Disponible sur: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial_resistance/EARS-Net/Pages/EARS-Net.aspx
 23. Robert J, Pantel A, Mérens A, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011–12. *J Antimicrob Chemother*. 1 oct 2014;69(10):2706-12.

24. Ibadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. oct 2009;34(4):340-2.
25. Souana D, Amir AS, Bekhoucha SN, Berrazeg M, Drissi M. Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2 β -lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria. *Med Mal Infect*. avr 2014;44(4):146-52.
26. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med*. mai 2012;18(5):263-72.
27. Lee J-Y, Hong Y-K, Lee H, Ko KS. High prevalence of non-clonal imipenem-nonsusceptible *Enterobacter* spp. isolates in Korea and their association with porin down-regulation. *Diagn Microbiol Infect Dis*. janv 2017;87(1):53-9.
28. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 oct 2014;453(2):254-67.
29. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*. avr 2015;28(2):337-418.
30. Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández M del C, Mallo S, Merino M, et al. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2012;56(4):2084-90.
31. Szabó D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, et al. Outer Membrane Protein Changes and Efflux Pump Expression Together May Confer Resistance to Ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2006;50(8):2833-5.
32. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of β -Lactamases and Porins in Resistance to Ertapenem and Other β -Lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2004;48(8):3203-6.
33. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. avr 2009;63(4):659-67.
34. Kourtesi C, Ball AR, Huang Y-Y, Jachak SM, Vera DMA, Khondkar P, et al. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. *Open Microbiol J*. 2013;7:34-52.
35. Ardebili A, Talebi M, Azimi L, Rastegar Lari A. Effect of Efflux Pump Inhibitor Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone on the Minimum Inhibitory Concentration of Ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Jundishapur J Microbiol*. janv 2014;7(1):e8691.
36. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mai 2011;70(1):119-23.

37. Bogaerts P, Cuzon G, Evrard S, Hoebeke M, Naas T, Glupczynski Y. Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum β -lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Int J Antimicrob Agents*. août 2016;48(2):189-93.
38. O'Connor C, Kiernan MG, Finnegan C, O'Hara M, Power L, O'Connell NH, et al. An optimized work-flow to reduce time-to-detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) using direct testing from rectal swabs. *Bioengineered*. 17 août 2016;1-8.
39. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. juill 2012;50(7):2441-3.
40. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. sept 2012;18(9):1503-7.
41. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. déc 2013;51(12):4281-3.
42. Bogaerts P, Yunus S, Massart M, Huang T-D, Glupczynski Y. Evaluation of the BYG Carba Test, a New Electrochemical Assay for Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. févr 2016;54(2):349-58.
43. Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, Glupczynski Y. Evaluation of a New Phenotypic OXA-48 Disk Test for Differentiation of OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 1 avr 2015;53(4):1245-51.
44. Glupczynski Y, Jousset A, Evrard S, Bonnin RA, Huang T-D, Dortet L, et al. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 22 mars 2017;
45. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. mars 2010;65(3):490-5.
46. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, CLSI Document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
47. Recommandations 2015 du CA-SFM - EUCAST - Société Française de Microbiologie. CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf [Internet]. [cité 24 avr 2017]. Disponible sur: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf

48. Wadhvani T, Desai K, Patel D, Lawani D, Bahaley P, Joshi P, et al. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *Internet J Microbiol* [Internet]. 31 déc 2008 [cité 16 févr 2017];7(1). Disponible sur: <http://ispub.com/IJMB/7/1/5909>
49. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0. Décembre 2013. [EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf) [Internet]. [cité 6 avr 2017]. Disponible sur: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf
50. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. mai 2012;18(5):432-8.
51. Huang T-D, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y, multicentre study group. Prevalence and mechanisms of resistance to carbapenems in Enterobacteriaceae isolates from 24 hospitals in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. août 2013;68(8):1832-7.
52. Treviño M, Moldes L, Martínez-Lamas L, Varón C, Regueiro BJ. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* and the emergence of metallo-beta-lactamase-producing strains in a third-level hospital (Santiago de Compostela, NW Spain). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. oct 2009;28(10):1253-8.
53. Ahn C, Syed A, Hu F, O'Hara JA, Rivera JI, Doi Y. Microbiological features of KPC-producing *Enterobacter* isolates identified in a U.S. hospital system. *Diagn Microbiol Infect Dis*. oct 2014;80(2):154-8.
54. Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. juill 2013;42(1):76-9.
55. Chung H-S, Yong D, Lee M. Mechanisms of ertapenem resistance in Enterobacteriaceae isolates in a tertiary university hospital. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. juin 2016;64(5):1042-9.
56. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 1993;37(5):939-46.
57. Antonelli A, D'Andrea MM, Di Pilato V, Viaggi B, Torricelli F, Rossolini GM. Characterization of a Novel Putative Xer-Dependent Integrative Mobile Element Carrying the blaNMC-A Carbapenemase Gene, Inserted into the Chromosome of Members of the *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. oct 2015;59(10):6620-4.
58. Boyd DA, Mataseje LF, Davidson R, Delport JA, Fuller J, Hoang L, et al. *Enterobacter cloacae* complex isolates harboring blaNMC-A or blaIMI-type class A carbapenemase

genes on novel chromosomal integrative elements and plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 21 févr 2017;AAC.02578-16.

59. Oliva A, Mascellino MT, Cipolla A, D'Abramo A, De Rosa A, Savinelli S, et al. Therapeutic strategy for pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* severe infections: short-course treatment with colistin increases the in vivo and in vitro activity of double carbapenem regimen. *Int J Infect Dis.* avr 2015;33:132-4.
60. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho P-L, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* juill 2012;67(7):1569-77.
61. Kavi J, Bhattacharjee D, Macve J, Weinbren MJ. Comment on: Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* janv 2013;68(1):246.
62. Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, Abuali M, LaBombardi VJ, Nicolau DP, et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *J Clin Microbiol.* juill 2010;48(7):2402-6.
63. Pailhoriès H, Cassisa V, Lamoureux C, Chesnay A, Lebreton C, Lemarié C, et al. Discordance in the minimal inhibitory concentrations of ertapenem for *Enterobacter cloacae*: Vitek 2 system versus Etest and agar dilution methods. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* janv 2014;18:94-6.
64. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2011;17(5):668-74.
65. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg GV, Hombach M. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol.* janv 2015;53(1):95-104.
66. Woodford N, Dallow JWT, Hill RLR, Palepou M-FI, Pike R, Ward ME, et al. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents.* avr 2007;29(4):456-9.
67. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative Evaluation of a Prototype Chromogenic Medium (ChromID CARBA) for Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Surveillance Rectal Swabs. *J Clin Microbiol.* juin 2012;50(6):1841.
68. Simner PJ, Gilmour MW, DeGagne P, Nichol K, Karlowsky JA. Evaluation of Five Chromogenic Agar Media and the Rosco Rapid Carb Screen Kit for Detection and Confirmation of Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* janv 2015;53(1):105.

69. Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P. Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* déc 2013;77(4):296-300.
70. Schurek KN, Wiebe R, Karlowsky JA, Rubinstein E, Hoban DJ, Zhanel GG. Faropenem: review of a new oral penem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* avr 2007;5(2):185-98.
71. Day KM, Pike R, Winstanley TG, Lanyon C, Cummings SP, Raza MW, et al. Use of faropenem as an indicator of carbapenemase activity in the Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* juin 2013;51(6):1881-6.
72. Koroska F, Göttig S, Kaase M, Steinmann J, Gatermann S, Sommer J, et al. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 1 mars 2017;55(3):877-83.
73. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2014;20(4):345-9.
74. Robert J, Pantel A, Merens A, Meiller E, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H, et al. Development of an algorithm for phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the routine laboratory. *BMC Infect Dis.* 17 janv 2017;17(1):78.
75. Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine M-H, Cavalié L, van der Mee-Marquet N, et al. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect.* déc 2014;20(12):O1121-3.
76. Dortet L, Cuzon G, Plésiat P, Naas T. Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 1 janv 2016;71(1):135-40.
77. Pournaras S, Maniati M, Spanakis N, Ikonomidis A, Tassios PT, Tsakris A, et al. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. *J Antimicrob Chemother.* oct 2005;56(4):761-4.
78. Kuo H-Y, Chang K-C, Kuo J-W, Yueh H-W, Liou M-L. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* janv 2012;39(1):33-8.
79. Zhang R, Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Lv HX, Hu QF, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* with high qnr prevalence in a Chinese hospital. *J Med Microbiol.* juill 2011;60(Pt 7):977-82.
80. Shi W, Li K, Ji Y, Jiang Q, Wang Y, Shi M, et al. Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1 β -lactamase production. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol.* 2013;44(2):435-42.

81. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 2001;45(1):105-16.
82. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PloS One.* 2013;8(3):e60666.
83. Zhang Y, Bao Q, Gagnon LA, Huletsky A, Oliver A, Jin S, et al. ampG gene of *Pseudomonas aeruginosa* and its role in β -lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2010;54(11):4772-9.
84. Korfmann G, Sanders CC. ampG is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 1989;33(11):1946-51.
85. Al-Agamy MH, Jeannot K, El-Mahdy TS, Samaha HA, Shibl AM, Plésiat P, et al. Diversity of Molecular Mechanisms Conferring Carbapenem Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Saudi Arabia. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Médicale* [Internet]. 2016 [cité 18 avr 2017];2016. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4997076/>
86. Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, Caceres NE, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1 mars 2007;59(3):378-86.
87. Recommandations 2015 du CA-SFM - EUCAST - Société Française de Microbiologie. Version 1.0. Mars. CASFMV1_0_MARS_2017.pdf [Internet]. [cité 6 avr 2017]. Disponible sur: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV1_0_MARS_2017.pdf
88. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* févr 2012;50(2):477-9.
89. Takayama Y, Adachi Y, Nihonyanagi S, Okamoto R. Modified Hodge test using Mueller-Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol.* juill 2015;64(7):774-7.

7. Annexes

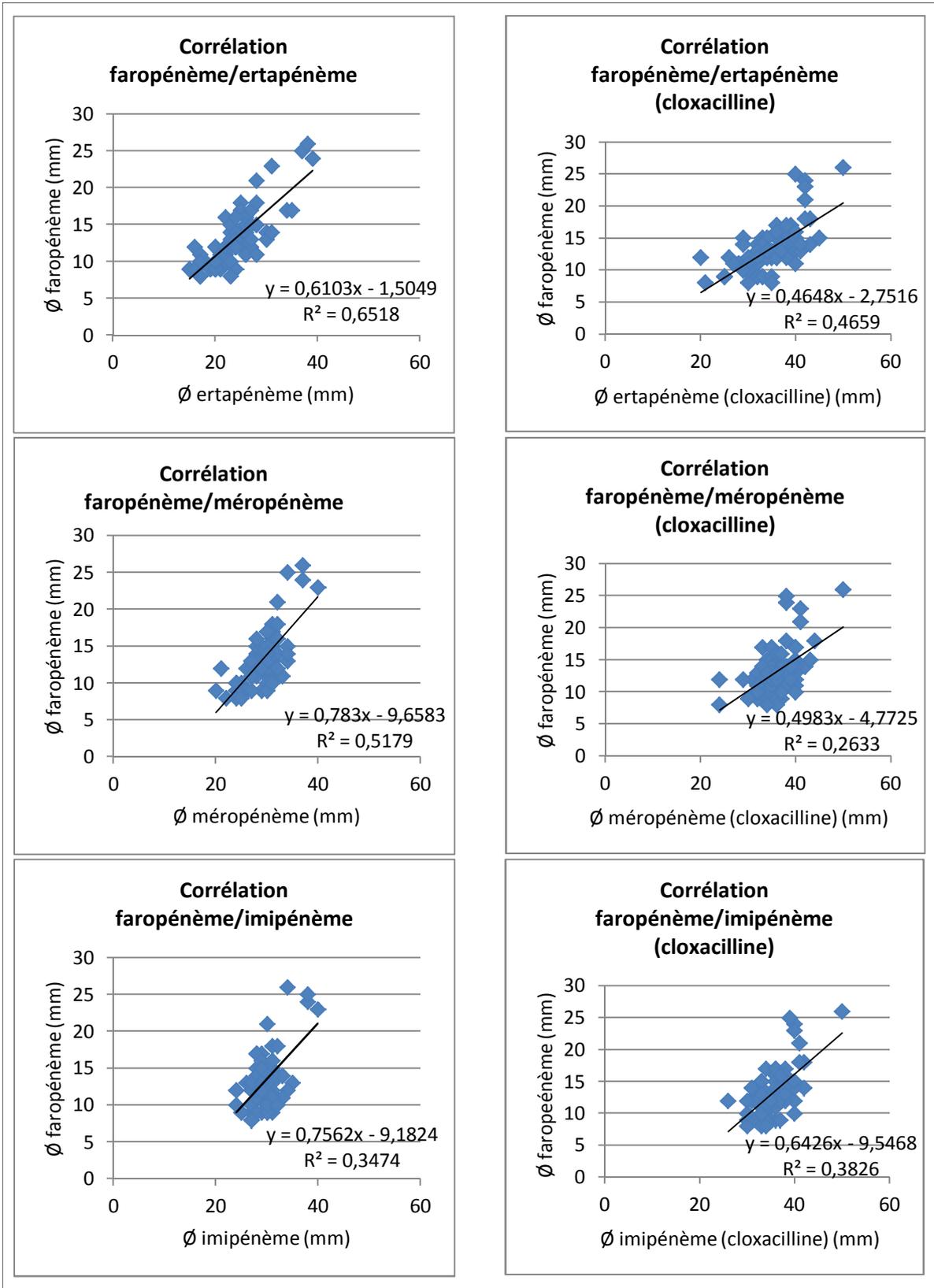
7.1. Annexe 1 : Amorces utilisées pour la recherche de carbapénémase par PCR

PCR	β -Lactamase(s) ciblée(s)	Amorce	Séquence (5'–3')	Taille de l'amplicon (pb)	Concentration des amorces (pmol/ μ L)	Réf.
Multiplex I (GES et OXA-48-like)	GES-1 à GES-9 et GES-11	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399	0.4	(45)
		MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT		0.4	
	OXA-48-like	MultiOXA-48_for	GCTTGATCGCCCTCGATT	281	0.4	
		MultiOXA-48_rev	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		0.4	
Multiplex II (IMP)	variants IMP sauf IMP-9, IMP-16, IMP-18, IMP-22 et IMP-25	MultiIMP_for	TTGACACTCCATTTACDG	139	0.5	
		MultiIMP_rev	GATYGAGAATTAAGCCACYCT		0.5	
Multiplex III (VIM et KPC)	variants VIM incluant VIM-1 et VIM-2	MultiVIM_for	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390	0.5	
		MultiVIM_rev	CGAATGCGCAGCACCAG		0.5	
	KPC-1 à KPC-5	MultiKPC_for	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC	538	0.2	
		MultiKPC_rev	ACGACGGCATAGTCATTTGC		0.2	
Simplex (NDM)	NDM incluant NDM-1	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	10	(36)
		NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		10	

7.2. Annexe 2 : Images positives ou difficilement interprétables observées pour les disques de faropénème

N° 1	N° 12	N° 13	N° 21	N° 23	N° 24
6 P	7 P	12 μ	12 μ	21 μ	17 μ
N° 26	N° 29	N° 33	N° 36	N° 37	N° 40
8 OXA	10 OXA	9 μ	9 μ	11 OXA	9 OXA
N° 41	N° 47	N° 53	N° 55	N° 56	N° 61
8 OXA	9 μ	14 μ	12 μ	12 μ	9 μ
N° 63	N° 65	N° 67	N° 69	N° 70	
10 OXA	10 OXA	9 OXA	9 OXA	8 OXA	
C+ OXA48	C+OXA48 (retesté)	C+ VIM	Diamètre d'inhibition (quand mesurable), puis en gras : <ul style="list-style-type: none"> • μ = microcolonies périphériques = interprété comme négatif / OXA-48 • OXA = microcolonies dans toute la zone d'inhibition = en faveur OXA-48 • P = en faveur carbapénémase KPC/MBL 		
12 μ ou OXA ?	12 OXA	6 P			

7.3. Annexe 3 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition du faropénème et les différents carbapénèmes



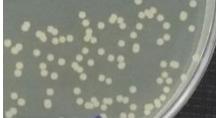
7.4. Annexe 4 : Résultats des contrôles et des 18 souches positives avec l'algorithme de criblage des carbapénémases (CASFM 2015)

N°	BLSE	CHN	Ø ERT (mm)	CMI ERT Vitek® (mg/L)	Ø TCC (mm)	Ø TEM (mm)	Ø MER (mm)	Ø IMI (mm)	Ø FEP (mm)	Ø MER cloxa (mm)	Ø IMI cloxa (mm)	Ø TEM cloxa (mm)	Esp.	Algo. O/N	Algo. avec TEM cloxa O/N
1	O	O	7	>8	9	8	12	12	17	24	30	15	EA	O	O
12	N	O	16	>8	9	15	18	18	24	34	36	26	EA	O	O
26	O	N	17	2	8	10	22	27	6	24	30	12	EC	O	O
68	N	O	20	4	10	8	29	34	15	36	38	12	EC	O	O
69	N	O	20	4	14	17	20	25	17	36	37	25	EA	O	O
2	O	O	21	4	10	10	28	29	17	34	33	15	EC	O	N
18	N	O	24	4	10	13	27	27	21	35	33	25	EC	O	N
20	N	O	26	2	8	12	32	32	23	38	37	25	EC	O	N
21	N	O	25	4	8	13	26	24	27	31	31	22	EC	O	N
30	O	O	23	4	7	14	30	28	7	33	31	18	EC	O	N
35	O	O	22	4	7	10	30	30	12	35	33	17	EC	O	N
36	O	O	15	>4	7	11	26	29	7	32	31	18	EC	O	N
37	O	O	17	4	7	13	27	31	8	32	33	18	EC	O	N
40	N	O	16	2	7	8	24	25	21	36	34	23	EC	O	N
47	O	O	15	>4	7	11	25	27	7	30	30	18	EC	O	N
50	N	O	27	1	8	14	30	28	25	35	36	23	EC	O	N
57	O	O	19	4	8	13	26	28	17	34	34	20	EC	O	N
66	O	O	22	4	8	11	27	28	15	35	34	16	EC	O	N
C+VIM	O	O	8	>32	6	6	9	12	6	11	15	6	EC	O	O
C+OXA-48	O	O	16	4	6	6	21	24	6	24	26	6	EC	O	O
C-	N	N	38	<0,5	34	30	37	34	40	50	50	40	EC	N	N

Ø : diamètre d'inhibition ; ERT : ertapénème ; TCC : ticarcilline-acide clavulanique ; TEM : témocilline ; MER : méropénème ; IMI : imipénème ; FEP : céfépime ; cloxa : gélose MH supplémentée de cloxacilline (200 mg/L) ; Esp. : Espèce ; EA : *Enterobacter aerogenes* ; EC : *Enterobacter cloacae* ; algo O/N : réponse de l'algorithme en faveur/défaveur d'une suspicion de carbapénémase

7.5. Annexe 5 : Isolats avec pousse non confluyente sur gélose supplémentée avec CCCP (20 µg/mL)

Souche n°	CMI intrinsèque CCCP (µg/mL)	Ø ERT sur gélose MH (mm)	Ø ERT sur gélose MH + CCCP (20 µg/mL) (mm)	Pousse sur gélose MH+CCCP (20 µg/mL) avec disque d'ertapénème	Pousse sur gélose MH+CCCP (20 µg/mL) sans disque d'ertapénème
30	100	23	30	+	+++
31	50	28	34	+	++
34	100	24	indéterminé	-/+	-/+
44	100	23	30	+	+
64	50	26	32	+	++
68	50	20	30	+	+
69	50	20	24	+	+++
Contrôle nég.	100	38	43	+	+

Pousse -/+	Pousse +	Pousse ++	Pousse +++
			

CMI : concentration minimale inhibitrice ; Ø : diamètre d'inhibition ; ERT : ertapénème

7.6. Annexe 6 : Image particulière « en cocarde » pour le contrôle avec une carbapénémase VIM



Gélose MH + CCCP
(20 µg/mL)



Gélose MH + cloxacilline
(200 mg/L)

Title: Microbiology laboratory investigation of carbapenem resistance in *Enterobacter sp.*

Abstract: Carbapenem resistance is a relatively frequently occurring phenomenon in *Enterobacter sp.* Carbapenemases are a major public health issue but are rarely found in France for that genus. The objective of this retrospective research was to evaluate the proportion of that resistance and of carbapenemases, as well as the performance of several tests in this population. 123 ertapenem non-susceptible (NS) strains were included from July 2015 to July 2016, of which 76 were finally tested. The estimated proportion of ertapenem NS *Enterobacter sp.* was 5.8 % and no carbapenemase was found. Ertapenem disk diffusion on cloxacillin-supplemented agar, selective agars, and a modified version of CASFM's carbapenemase detection algorithm displayed good performances. Faropenem lacked specificity and had interpretation difficulties. Phenotypic efflux mechanism investigation didn't show conclusive results and further testing by molecular methods could be appropriate.

Keywords: *Enterobacter*, resistance, carbapenem, carbapenemase, efflux

AUTEUR : Julian WEITZ

TITRE : **Exploration au laboratoire de la résistance aux carbapénèmes chez *Enterobacter sp.***

DIRECTEUR DE THÈSE : Dr. Laurent CAVALIÉ

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté de Médecine Purpan (Toulouse), le 15 mai 2017

RÉSUMÉ : La résistance aux carbapénèmes est un phénomène relativement fréquent chez *Enterobacter sp.* Les carbapénémases, qui constituent un enjeu majeur de santé publique, sont rarement retrouvées en France pour ce genre. L'objectif de cette étude rétrospective était d'évaluer la proportion de cette résistance et de carbapénémases, ainsi que la performance de différents tests dans cette population. 123 souches non-sensibles (NS) à l'ertapénème ont été incluses entre juillet 2015 et juillet 2016 dont 76 ont finalement été testées. La proportion estimée d'*Enterobacter sp.* NS à l'ertapénème était de 5,8 % sans carbapénémase identifiée. L'ertapénème en diffusion sur gélose avec cloxacilline, les géloses sélectives, et une version modifiée de l'algorithme de criblage du CASFM ont montré de bonnes performances. Le faropénème manquait de spécificité avec des difficultés d'interprétation. L'exploration phénotypique des mécanismes d'efflux était peu concluante et l'application de méthodes moléculaires serait pertinente.

TITLE: **Microbiology laboratory investigation of carbapenem resistance in *Enterobacter sp.***

ABSTRACT: Carbapenem resistance is a relatively frequently occurring phenomenon in *Enterobacter sp.* Carbapenemases are a major public health issue but are rarely found in France for that genus. The objective of this retrospective research was to evaluate the proportion of that resistance and of carbapenemases, as well as the performance of several tests in this population. 123 ertapenem non-susceptible (NS) strains were included from July 2015 to July 2016, of which 76 were finally tested. The estimated proportion of ertapenem NS *Enterobacter sp.* was 5.8 % and no carbapenemase was found. Ertapenem disk diffusion on cloxacillin-supplemented agar, selective agars, and a modified version of CASFM's carbapenemase detection algorithm displayed good performances. Faropenem lacked specificity and had interpretation difficulties. Phenotypic efflux mechanism investigation didn't show conclusive results and further testing by molecular methods could be appropriate.

Mots-Clés: *Enterobacter*, résistance, carbapénème, carbapénémase, efflux

Discipline administrative : BIOLOGIE MÉDICALE

Faculté de Médecine Rangueil – 133 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 - France