

ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
FES



LES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE CARBAPENEMASES : ETUDE PROSPECTIVE

MEMOIRE PRESENTE PAR :
Docteur GHITA YAHYAOUI
née le 05 Mai 1982 à Fès

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE
OPTION : BIOLOGIE MEDICALE

Sous la direction de :
Professeur MUSTAPHA MAHMOUD

Jun 2013

SOMMAIRE

Introduction.....	3
Matériel et méthodes.....	5
Résultats.....	14
Discussion.....	26
1. Carbapénémases de classe A.....	28
2. Carbapénémases de classe D ou oxacillinases	31
3. Carbapénémases de classe B ou métallo- β -lactamases	33
4. Prise en charge des infections à entérobactéries productrices de carbapénémases.....	35
a) Screening des carbapénémases.....	35
b) Mesures de prévention.....	36
ü Identification des patients porteurs de BMR	37
ü Précaution d'isolement.....	38
Conclusion.....	40
Résumé	42
Bibliographie	45

INTRODUCTION

Les carbapénèmes « Imipenème, Méropénème, Ertapénème et Doripénème » sont aujourd’hui parmi les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (BLSE), ou encore dans la prise en charge des infections à BGN multi résistants tels *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Mais leur utilisation pourrait être compromise par l’émergence de souches également résistantes à ces molécules.

L’émergence de la résistance aux carbapénèmes est l’un des problèmes les plus importants posé par la résistance croisée aux autres familles d’antibiotiques car il existe peu d’alternatives thérapeutiques possibles.

Cette résistance reste beaucoup plus fréquente en milieu hospitalier qu’en milieu communautaire, en rapport avec la pression de sélection exercée par l’usage massif des antibiotiques et le support plasmidique favorisant une rapide et large diffusion [1].

Au Maroc, l’incidence des entérobactéries sécrétrices de carbapénémases n’est pas encore bien illustrée. Par manque de données épidémiologiques nationales, on a procédé à la réalisation de ce travail au sein des services de réanimation du CHU Hassan II de Fès. Des travaux pareils, réalisés à l’échelle nationale, permettront d’estimer l’incidence de ce fléau émergent et d’améliorer les protocoles de lutte contre les infections nosocomiales.

Le but de ce travail est d’étudier l’état des lieux concernant les entérobactéries productrices de carbapénémases et leur émergence aux services de réanimation du CHU Hassan II de Fès, puis de faire le point sur les outils de détection et de confirmation nécessaires à la mise en évidence des carbapénémases de façon générale.

MATERIELS ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective portant sur 100 malades colligés au sein des services de réanimation du CHU Hassan II de Fès, sur une période de 10mois.

Les prélèvements rectaux sont acheminés directement au laboratoire de Bactériologie et ont été ensemencés sur milieu EMB avec un disque d'értapénème.

I. La collecte des données

1. Fiche d'exploitation

La collecte des données est réalisée grâce à une fiche d'exploitation remplie et mise à jour par le médecin réanimateur lors de chaque prélèvement. Elle renseigne sur les caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients, à savoir :

- Ø Index patient (IP) : pour la confidentialité
- Ø Caractéristiques épidémiologiques : Age, Sexe, Provenance
- Ø Paramètres cliniques, notamment la gravité des tableaux cliniques, ainsi que l'ensemble des critères qui définissent une infection nosocomiale (durée de séjour en réanimation, antécédents d'hospitalisation, gestes invasifs...).

Fiche d'exploitation

Identité IP : Nom : Age : Sexe :

Provenance Urgences Service de médecine
Domicile Privé Service de chirurgie

Motif d'hospitalisation :

Date d'hospitalisation :

Hospitalisation antérieure : Non Oui

Si oui ; Service :

Durée d'hospitalisation :

Intervalle de réadmission :

Infection à l'admission : Non Oui

Si oui ; Type :

ATB :

Durée :

Evolution : Favorable défavorable , Type :

Antécédents

Médicaux :

Chirurgicaux :

Toxiques :

Hospitalisation antérieure : Oui Non

Durée d'hospitalisation :

Réanimation : Oui Non

Intervalle pour la réadmission en réanimation :

Cause :

2. Prélèvement rectal

Il est réalisé à l'admission du patient au service de réanimation, et renouvelé une fois par semaine pour le suivi. Cette étape, particulièrement, a connu certaines difficultés, notamment : le refus de certains patients, ce qui a entravé leur suivi.

L'acheminement des prélèvements rectaux vers le laboratoire de bactériologie s'est déroulé dans des conditions optimales afin de préserver la vitalité des bactéries (acheminement et ensemencement immédiat des écouvillons sur le milieu de culture EMB).

Après ensemencement de l'écouvillon sur une boîte Pétri contenant le milieu EMB, un disque d'Ertapénème (10 μ g) est déposé au centre de la boîte.

L'incubation se déroule pendant 24 heures à une température de 37-38°C. Seules les souches ayant un diamètre de la zone d'inhibition <21mm autour du disque de l'Ertapénème sont suspectes d'être résistantes.

L'étape suivante consiste à la purification des souches et à la réalisation d'une coloration Gram afin d'isoler les BGN.

3. Identification des souches

L'identification des bactéries était faite par les techniques bactériologiques usuelles notamment en utilisant les galeries API 20E.

Les souches ainsi purifiées et identifiées sont conservées dans des tubes stériles, après les avoir inoculées dans 1ml du milieu de culture BHI et incubées à 37°C pendant 24h. On rajoute une ou deux gouttes de Glycérol. La température de conservation des souches est -20°C.

4. Etude de la susceptibilité aux antibiotiques

La susceptibilité aux antibiotiques était réalisée par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton. Différents antibiotiques, β -lactamines et non β -lactamines ont été testés. Les résultats étaient interprétés selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI.

5. Test de Hodge modifié

Les études réalisées pour évaluer les performances de ce test ont permis de standardiser son protocole d'utilisation. Il consiste à inoculer un milieu gélosé de Muller Hinton avec une suspension d'E.coli ATCC 25922 (dilution au 1/10 d'une suspension 0,5 McFarland). Un disque de carbapénèmes (10 μ g) est disposé au centre de la gélose. A partir de suspensions de colonies bactériennes suspectées de production de carbapénémases, on réalise des stries de 20 à 25 mm en partant du disque de carbapénèmes vers l'extrémité de la gélose. La lecture se fait après incubation à 35 \pm 2°C en atmosphère aérobie. Il s'agit d'examiner l'intersection entre la zone d'inhibition de la souche de référence utilisée et la strie de celle suspectée d'être productrice de carbapénémase. La pousse d'E. coli ATCC 25922 à proximité du disque de carbapénèmes autour de la strie de la souche suspecte réalise une image de dépression dans la gélose signalant une activité carbapénémase [Figure 1]. A l'inverse, si la pousse d'E. coli ATCC 25922 continue à être inhibée même en présence de la souche suspecte (zone d'inhibition parallèle à la strie réalisée) le résultat du test est négatif [Figure 1].

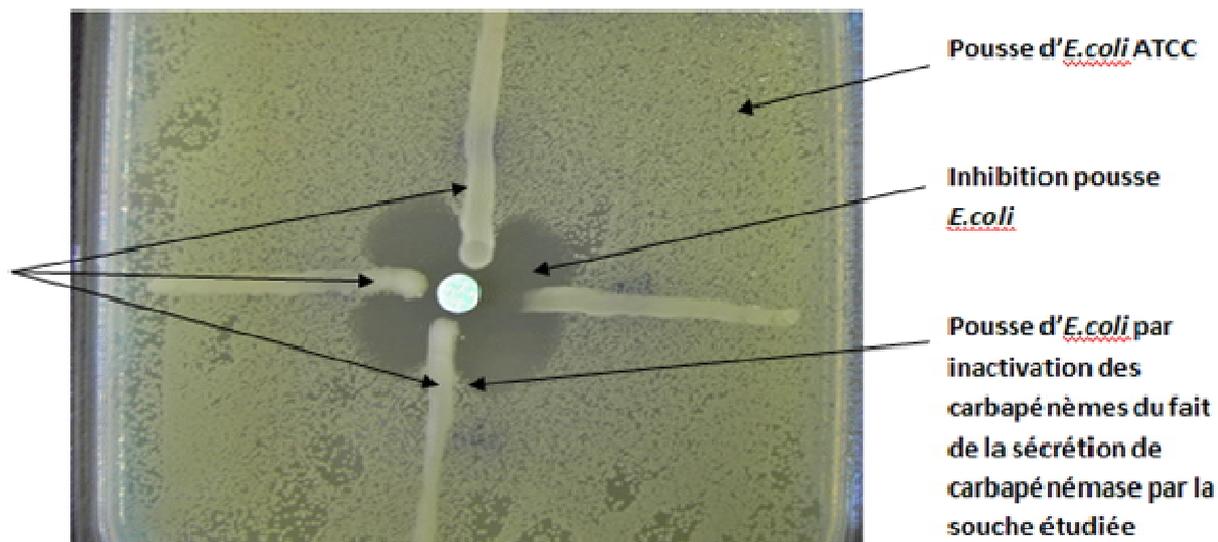


Figure 1 : Exemple de 3 souches présentant un test de Hodge positif

6. E-Test

Ensuite, afin de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des souches Carbapénèmases+ par le E-Test.

A rappeler que la CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber in vitro toute culture visible de la souche étudiée pendant une période d'incubation définie. Elle s'exprime en mg/l ou µg/ml.

Le E-test® est appliqué sur la surface d'un milieu gélosé préalablement inoculé. Après incubation, on observe une ellipse d'inhibition. Au point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette, la concentration en antibiotique correspond à la CMI de la souche étudiée.

Le E-test permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Ce gradient couvre une zone qui, en fonction des molécules, varie de 0,016 à 256 mg/L ou de 0,002 à 32 mg/L. Le E-test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5

mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture, imprimé sur la bandelette, permet une interprétation rapide.

Lorsque la zone d'inhibition est nette et parfaitement symétrique, la lecture ne pose aucun problème. Dans tous les autres cas, une interprétation est nécessaire : une zone de décrochage dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse ; la présence de colonies "squatter" doit être analysée (résistance hétérogène, émergence de mutants résistants, mélange bactérien) ; la présence d'une croissance en ligne le long de la bandelette n'est pas prise en compte et résulte certainement d'un séchage insuffisant de la surface du milieu ; une asymétrie des points d'intersection de l'ellipse avec la bandelette conduit à lire la CMI au niveau le plus élevé.

7. Tests d'inhibition

Après avoir réalisé le E-Test et déterminé ainsi les CMI des quatre souches résistantes, l'étape suivante consiste à réaliser des tests de synergie afin de classer les Carbapénèmases. Ces tests nous renseignent sur les phénotypes de ces enzymes (Oxa, VIM, CTX..) et ils sont réalisés comme suit :

è Classe A

Sur un milieu MH, on dépose un disque d'imipénème et on met à différentes distances (1,5cm ; 2cm et 2,5cm) des disques d'antibiotique Augmentin (Amoxicilline + l'Acide Clavulanique). En se basant sur le fait que la classe A des Carbapénèmases soit inhibée par l'acide clavulanique, on doit s'attendre à observer une zone d'inhibition autour du disque d'Augmentin à une des distances déjà citées.

è Classe B

Concernant la classe B des Carbapénèmases, elle est inhibée par l'agent chélateur : EDTA, et pour révéler cette classe in vitro, deux disques d'imipénème (10 μ g) dont l'un additionné de 10 μ l d'EDTA 0,1M (292 μ g) étaient placés à une distance de 25mm (centre à centre) l'un de l'autre. Une augmentation du diamètre d'inhibition \geq 4mm du disque IMP+EDTA par rapport au disque IMP seul était considérée en faveur de la présence d'une métallo- β -lactamase [Figure 2].

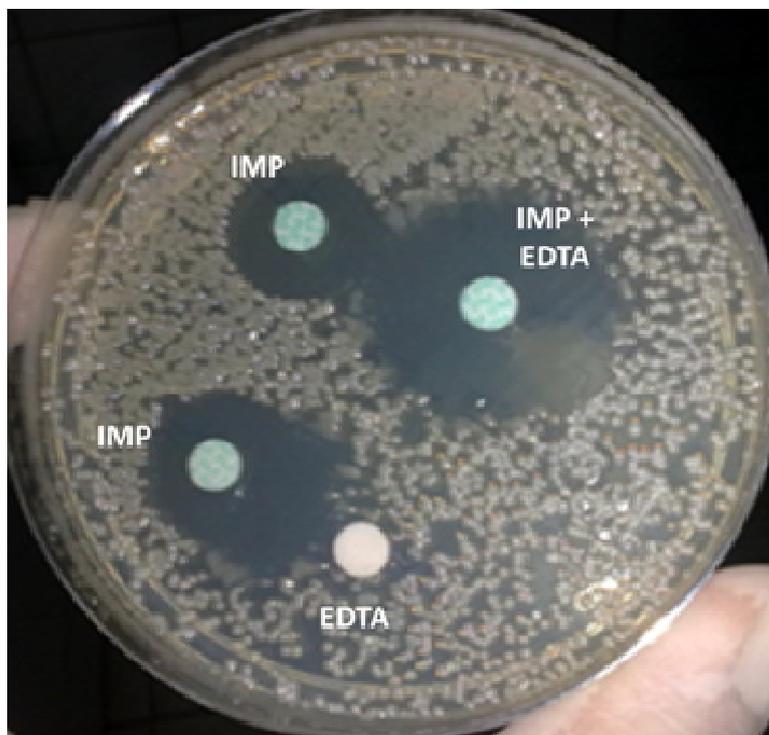


Figure2 : Exemple d'un test d'inhibition à l'EDTA positif

è Classe D

Finalement, la classe D est distinguée par les autres classes des Carbapénèmases par le fait qu'elle n'est inhibée ni par l'Acide Clavulanique ni par l'EDTA.

Le dernier test consiste à vérifier l'association des souches Carbapénèmases au BLSE. Il est réalisé sur un milieu MH, en déposant au centre un disque d'Augmentin entouré par trois disques d'antibiotiques appartenant au groupe de céphalosporines. Après incubation, l'association aux BLSE est révélée par une zone d'inhibition particulière sous forme d'un bouchon.

RESULTATS

I. Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients

1. Nombre de prélèvements

Au cours de cette étude, on a pu rassembler 100 prélèvements rectaux sur une période de 10 mois.

2. Sex-ratio

La majorité des patients auxquels les prélèvements rectaux ont été réalisés appartiennent au sexe féminin, avec un sex-ratio de 0,58.

3. Age moyen

L'âge moyen des patients auxquels nous avons réalisé les prélèvements rectaux était de 54 ans avec des extrêmes d'âge allant de 17 ans à 100 ans.

4. Provenance

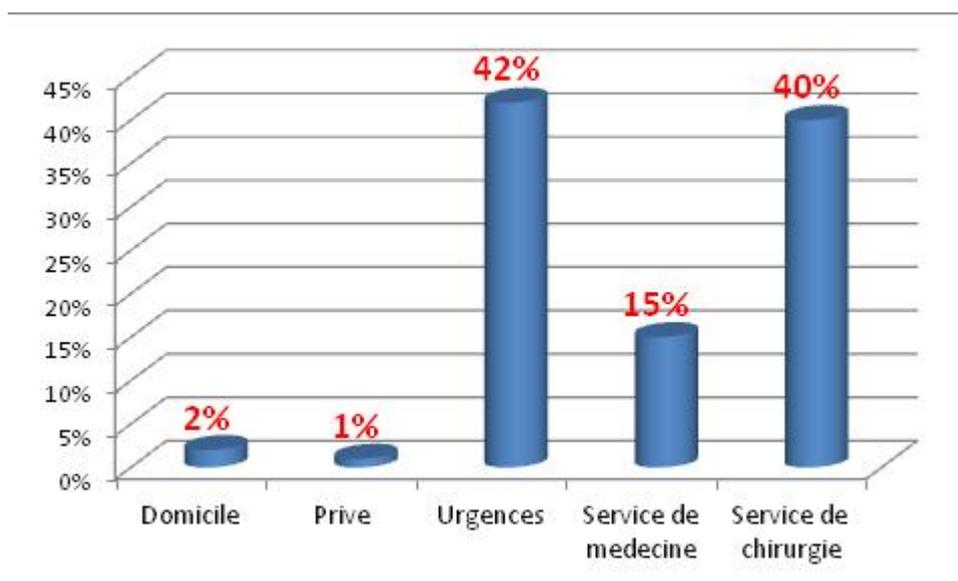


Figure 3 : Répartition des patients en fonction des services de provenance

La majorité des patients proviennent des urgences et des services de chirurgie. 2% uniquement ont été directement hospitalisés en réanimation sans transiter par un autre service.

5. Antécédents

Les antécédents les plus fréquemment retrouvés sont : le diabète, l'hypertension artérielle, la tuberculose pulmonaire et le tabagisme.

6. Gestes invasifs

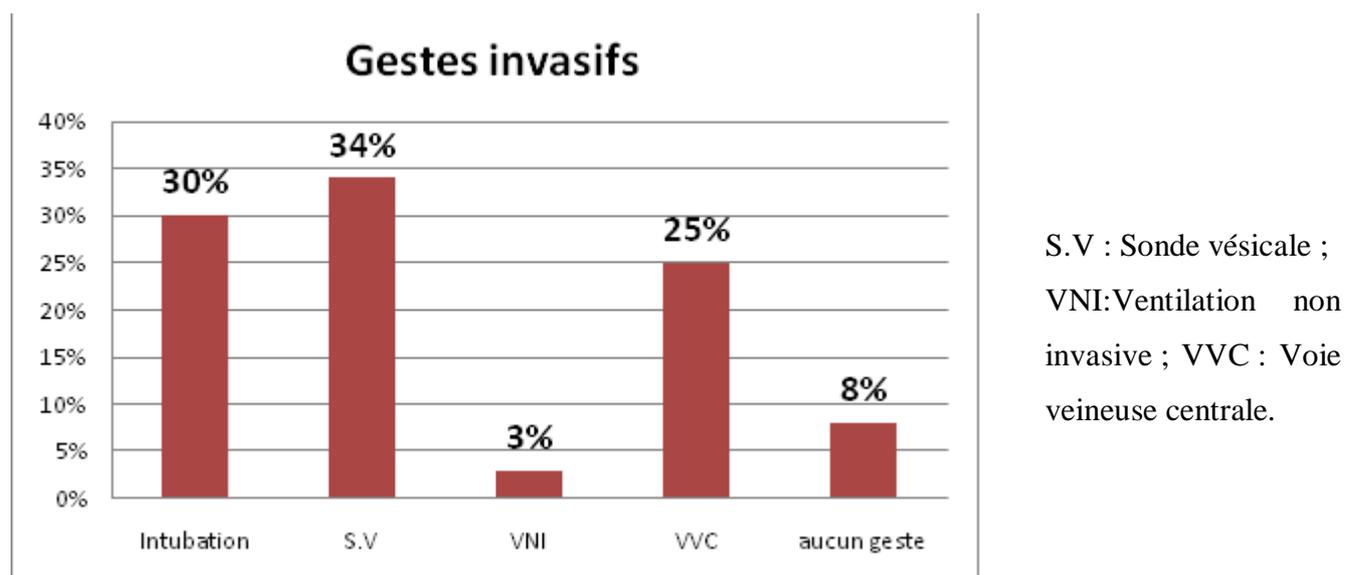


Figure 4 : Diagramme montrant l'ensemble des gestes invasifs subis par les patients

92% des patients ont bénéficié d'un geste invasif.

II- Etude bactériologique :

1. Les germes isolés :

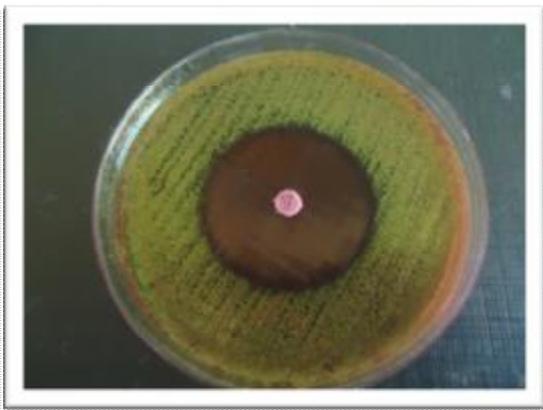
Sur les 100 prélèvements rectaux, on a isolé :

- 95 entérobactéries ;
- 5 germes autres que les entérobactéries.
- Les non entérobactéries ont été exclues de notre étude.

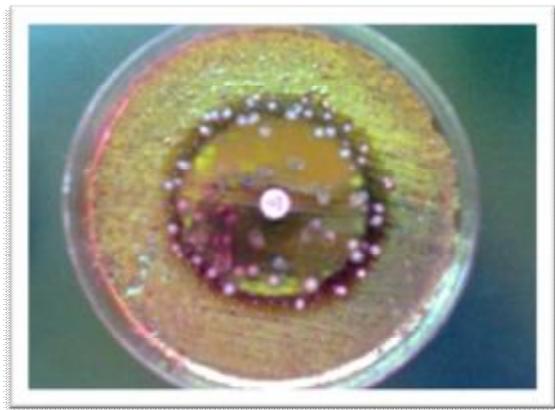
2. La résistance aux Carbapénèmes :

Parmi les 95 entérobactéries, on a isolé :

- 91 souches Carbapénèmases Négatives;
- 4 souches Carbapénèmases Positives (productrices des enzymes Carbapénèmases).

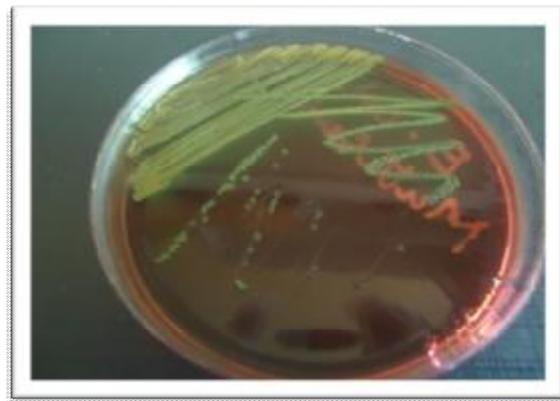


Souche sensible



Souche résistante

Les souches résistantes à l'értapénème franchissent le diamètre d'inhibition et poussent ainsi autour du disque d'értapénème. Ces souches se situant à proximité du disque, sont isolées sur un milieu EMB et sont ensuite purifiées afin de leur réaliser le test phénotypique confirmatif d'une carbapénémase : le Hodge test.



Souche contrôle, Carbapénèmase- Souche révélatrice, E.Coli multisensible

Ces deux figures représentent l'aspect des souches avec lesquelles le test de Hodge est réalisé : il s'agit d'une souche carbapénémase-, appelée souche de référence ou souche contrôle et une souche révélatrice d'E.coli sauvage.



Test de Hodge-



Test de Hodge+

La souche carbapénèmase positive (càd test de Hodge+) est révélée par un aspect particulier d'une zone ayant l'aptitude de s'incurver et de s'insérer vers le disque d'antibiotique. Cet aspect s'explique par le fait que la souche carbapénèmase+ a transféré un plasmide ou un transposon (éléments mobiles) vers la souche sensible d'E. Coli en la rendant ainsi résistante.

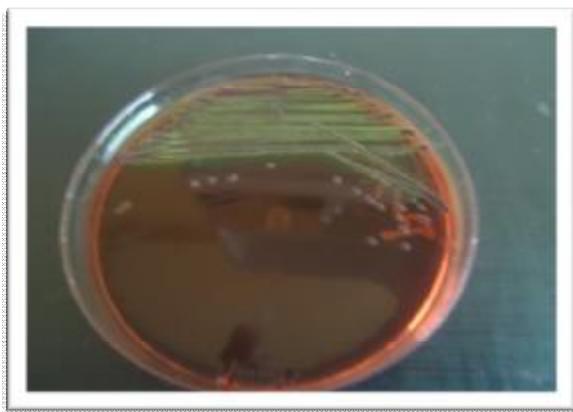
Les 4 souches Carbapénèmases positives :



Souche R47



Souche R53



Souche R74

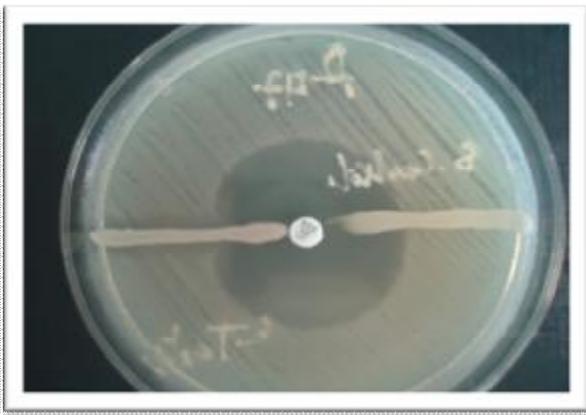


Souche R76

Sur ces quatre souches, on distingue deux types de colonies :

- Ø Des colonies violettes, semi-bombées, de 2 à 3mm de diamètre, avec un éclat vert métallique, et un centre sombre. Ces colonies sont représentées par les souches R53 et R74 : il s'agit *E. coli*.
- Ø Et des colonies de couleur violet, très bombées, muqueuses, de diamètre de 5 mm et à un centre gris marron sans reflet. Ces colonies sont représentées par les souches R47 et R76 : il s'agit de *Klebsiella*.

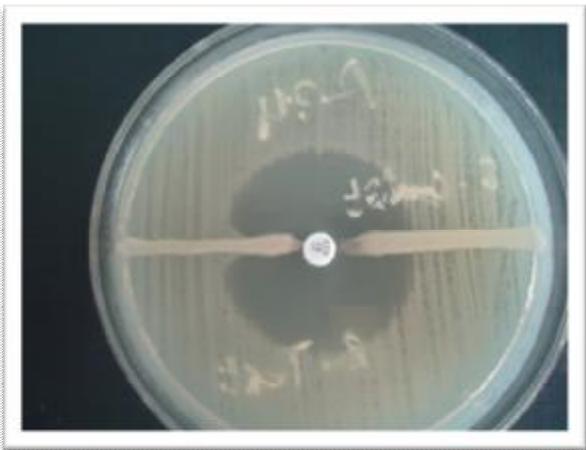
Test de Hodge effectué pour les 4 souches résistantes



Souche R47



Souche R53



Souche R74



Souche R76

Ces quatre figures montrent l'aspect des souches carbapénèmases+ sur le milieu MH.

3. Identification des souches Carbapénèmases+ :

L'identification des quatre souches résistantes est réalisée grâce à la méthode classique de la Galerie Api 20E.

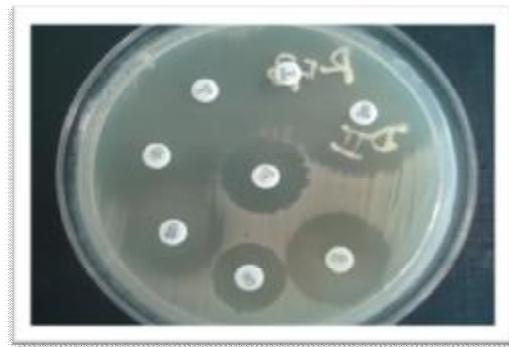
✚ *La souche R74 , R53 : Escherichia coli.*

✚ *La souche R76, R47 : Klebsiella pneumoniae.*

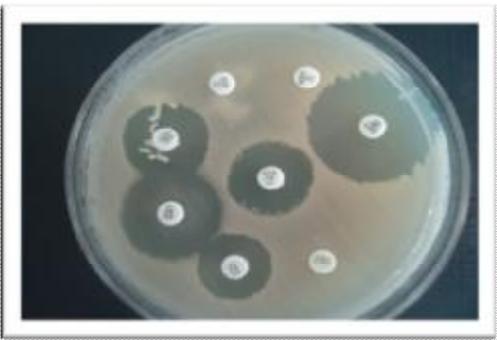
4. Antibiogrammes des souches Carbapénèmases +:



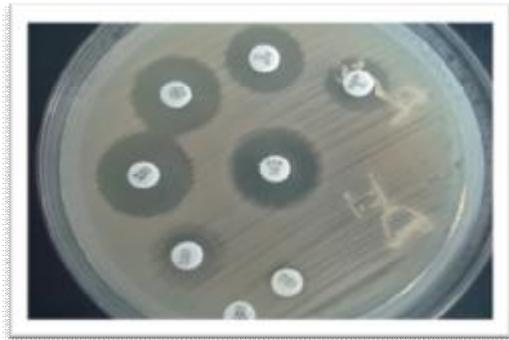
Souche R47



Souche R53



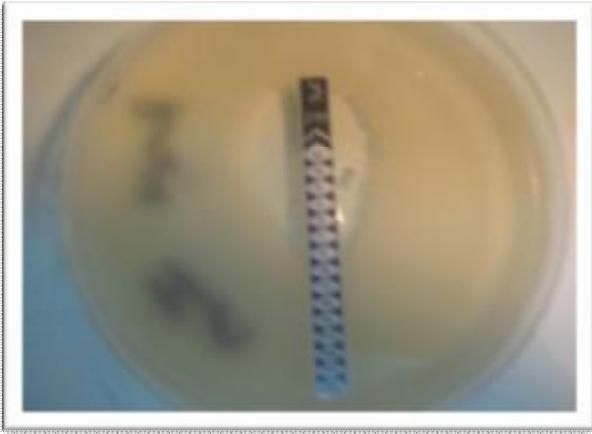
Souche R74



Souche R76

Les quatre souches se sont révélées résistantes à l'értapénème (le disque déposé au centre). Les diamètres d'inhibition des souches ne dépassent pas généralement les 21mm (<21mm).

5. Résultats du E-Test :



Souche R47



Souche R53



Souche R74



Souche R76

Les CMI des quatre souches résistantes sont déduites par l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bandelette :

- ✚ *La souche R47* : CMI=2mg /l ;
- ✚ *La souche R53* : CMI=1mg /l ;
- ✚ *La souche R74* : CMI=0,12mg /l ;
- ✚ *La souche R76* : CMI=0,25mg /l.

6. Résultats des tests de synergie



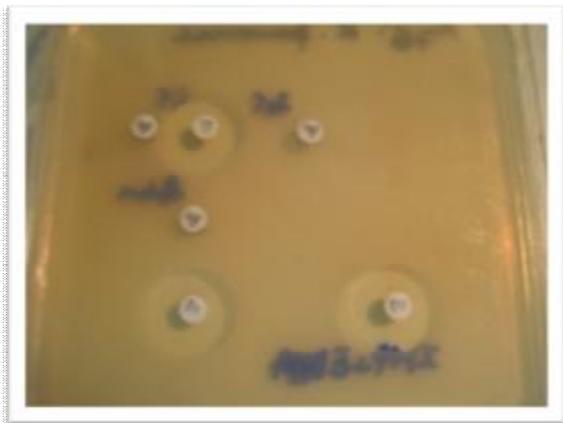
Souche R47



Souche R53



Souche R74

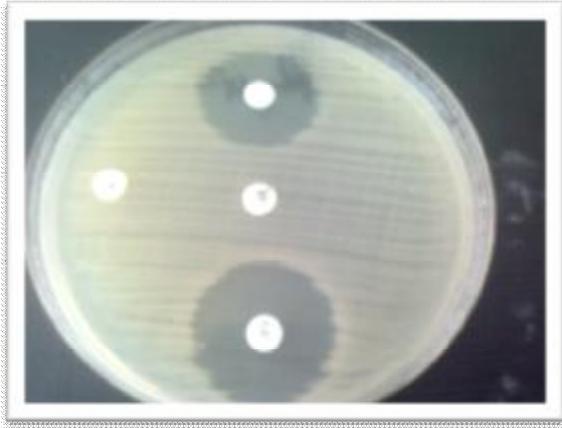


Souche R76

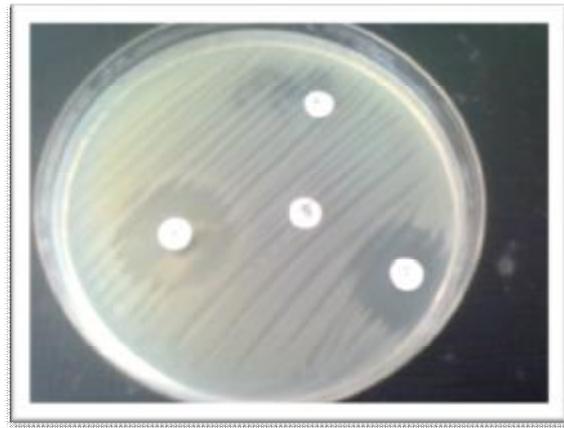
Les quatre souches résistantes n'appartiennent ni à la classe A ni à la classe B des Carbapénémases ; elles ne sont inhibées ni par l'acide clavulanique ni par l'EDTA.

Donc, les carbapénémases identifiés dans notre étude appartenaient à la classe D de la classification d'Ambler, dont le phénotype Oxa 48 est le plus répandu.

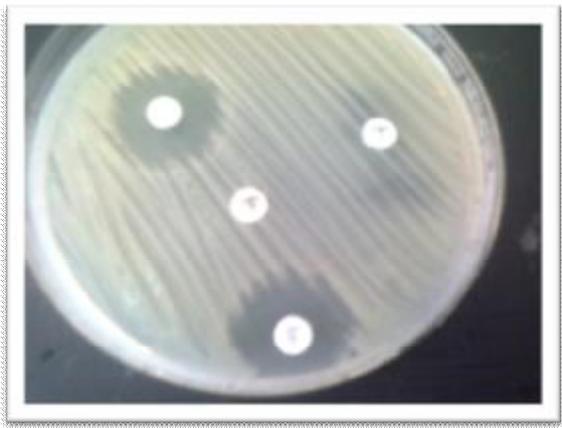
7. Résultats de test d'association aux BLSE



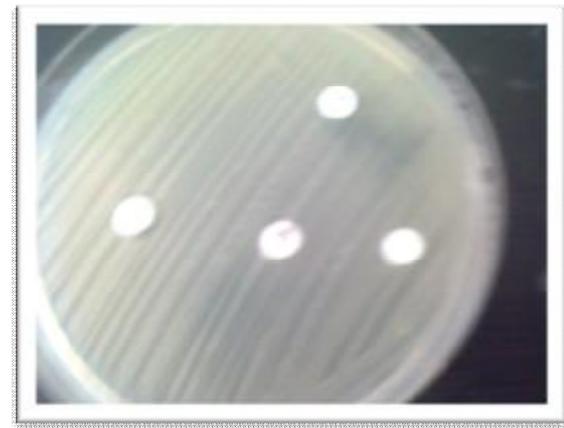
Souche R47



Souche R53



Souche R74



Souche R76

A partir des figures des quatre souches, on n'observe pas la formation d'une zone d'inhibition particulière sous forme de bouchon.

è Donc, aucune des quatre souches carbapénèmases+ n'est associée à des BLSE.

8. Caractéristiques des patients porteurs des souches résistantes

*R47 : le patient a séjourné pendant 10 jours en service de chirurgie viscérale avant son admission en réanimation, le prélèvement rectal est réalisé à Jour1 de son hospitalisation en réanimation. Il a pris des antibiotiques : Imipénème.

*R53 : le patient a séjourné pendant 7 jours en service de chirurgie vasculaire avant son admission en réanimation, le prélèvement rectal est réalisé à Jour1 de son hospitalisation en réanimation. Il n'a pris d'antibiotiques.

*R74 : le patient a séjourné pendant 7 jours en service de chirurgie vasculaire avant son admission en réanimation, le prélèvement rectal est réalisé à Jour1 de son hospitalisation en réanimation. Il n'a pris d'antibiotiques.

*R76 : le patient est admis directement en service de réanimation. Mais le prélèvement rectal est réalisé 2 mois plus tard, et après prise d'antibiotique (Imipénème). On n'a pas pu réaliser un 2ème prélèvement de contrôle (le patient est décédé entretemps).

Tableau 1 : Tableau définissant les caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients ayant des carbapénémases.

Prélèvement	Provenance	Durée du premier séjour	Date d'admission en réanimation	Date du prélèvement	Antibiothérapie	Evolution
R 47	Chirurgie viscérale	10 jours	03-04-12	04-04-12	Tienam Amiklin Colimycine	Favorable
R 53	Chirurgie vasculaire	1 semaine	16-04-12	17-04-12	Pas d'ATB	Favorable
R 74	Chirurgie vasculaire	1 semaine	30-04-12	02-05-12	Pas d'ATB	Favorable
R 76	Domicile		02-03-12	02-05-12	Tiénam Targocid	Décédé

DISCUSSION

Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes est principalement due à deux mécanismes impliquant des β -lactamases. Le premier associe la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou une BLSE, à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des protéines transmembranaires que sont les porines. Ce dernier mécanisme a été décrit il y a plus de vingt ans tout d'abord chez *Enterobacter* spp puis dans d'autres espèces d'entérobactéries qui produisent naturellement une céphalosporinase (*Serratia* sp, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*,...) [1]. Plus récemment, des mécanismes assez similaires de résistance aux carbapénèmes ont été décrits combinant une céphalosporinase plasmidique (DHA-1, cmY-2...) ou une BLSE (TEM, SHV, CTX-M...) à une imperméabilité dans des espèces d'entérobactéries qui n'expriment pas naturellement de céphalosporinase (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp) [2-3-4]. Plusieurs études suggèrent que ces résistances sont réversibles du fait de l'instabilité de la modification des porines [1]. Une telle modification entraînerait une limitation de croissance bactérienne liée à une moindre utilisation de substrats nécessaires à la multiplication.

Le second mécanisme de résistance aux carbapénèmes est lié à l'expression de β -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases, qui appartiennent aux classes A, B et D [5,6]. Il est plus important d'un point de vue clinique car il compromet le plus souvent l'efficacité de presque toutes les bêta-lactamines.

Il est stable et survient chez des souches qui sont très souvent multirésistantes à d'autres familles d'antibiotiques. Par ailleurs, les gènes codant pour ces enzymes sont situés sur des éléments génétiques très mobiles (plasmides, transposons...) qui rendent leur diffusion plus large et leur maîtrise d'autant plus complexe.

Les carbapénémases décrites chez les entérobactéries appartiennent aux trois classes A, B et D du système d'Amblar [7, 8]. Les plus importantes cliniquement sont actuellement les β -lactamases de type KPC, IMP/VIM, OXA-48 et plus récemment les NDM-1. Au Maroc, les carbapénémases décrites à aujourd'hui chez les entérobactéries appartiennent aux classes B et D.

Les bêta-lactamases de classe A ont une activité qui est totalement ou partiellement inhibée in vitro par l'acide clavulanique et le tazobactam alors que les autres types de β -lactamases ne sont pas inhibés par ces inhibiteurs classiques [3].

1. Carbapénémases de classe A

Les carbapénémases de classe A ont été tout d'abord rapportées dans plusieurs souches d'entérobactéries isolées de l'environnement (*Serratia*, *Enterobacter*), produisant des β -lactamases dont l'activité était inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam [5, 6]. Elles hydrolysent, à divers degrés, toutes les bêta-lactamines [5,6]. Leurs gènes sont chromosomiques ou plasmidiques [5,6]. On peut les détecter par une synergie entre le disque d'amoxicilline- acide clavulanique (AMC) et celui d'imipénème (IMP ou IPM) [3].

Phénotypiquement, on peut distinguer deux groupes : le premier se caractérise en plus par un haut niveau de résistance à l'aztréonam et une sensibilité presque normale aux céphalosporines de troisième génération (C3G) comme Nmc-A (non metallo-carbapenemase), Sme-1 , Sme-2 (*Serratia marcescens* enzyme) et IMI-I, (IMIpenemase) alors que KPC-1, KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) et GES-2 (Guyana extended spectrum β -lactamase) confèrent également un haut niveau de résistance aux C3G [3,7]

Les carbapénémases de classe A, les plus fréquentes et les plus menaçantes, sont les carbapénémases de type KPC (KPC-2 à KPC-8) [8].

La première souche productrice de KPC-1 a été isolée en 1996 en Caroline du Sud [9]. Il s'agissait d'une souche de *K. pneumoniae* résistante à toutes les β -lactamines. Cette première description a été rapidement suivie par la publication d'un autre variant KPC-2 [10]. Depuis, un nouveau séquençage du gène blaKPC-1 a révélé une parfaite homologie avec blaKPC-2 [11] et sept autres variants ont été rapportés (KPC-3 à KPC-9), se distinguant par au moins deux substitutions d'acides aminés.

Au Maroc, aucun cas de carbapénémase de type KPC n'a été décrit à ce jour.

Les données biochimiques montrent que les enzymes de type KPC sont capables d'hydrolyser toutes les β -lactamines [9], à l'exception des céphamycines et de la céftazidime dont l'activité est peu modifiée. Parmi les C3G, le céfotaxime est la molécule la plus hydrolysée, et parmi les carbapénèmes, KPC possède l'affinité la plus élevée pour le méropénème. L'acide clavulanique et le tazobactam inhibent tous deux faiblement l'activité de KPC, le second étant le plus efficace [3].

Les enzymes de type KPC ont un spectre d'hydrolyse comparable à celui des BLSE de type TEM, SHV, CTX-M ou VEB qui hydrolysent les céphalosporines exceptées les céphamycines et sont également sensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique, avec, en plus, une extension de ce spectre aux carbapénèmes [3]. Elles peuvent donc être confondues avec des BLSE, ce d'autant plus lors de l'analyse d'un antibiogramme en diffusion, l'hydrolyse des carbapénèmes se traduit par une diminution de la sensibilité et non par une véritable résistance qui n'est généralement visible qu'en cas de mécanismes de résistance supplémentaires telle que de l'imperméabilité [3].

Sur le plan génétique, les études montrent que ces gènes KPC sont localisés sur une variété importante de plasmides mais qu'ils sont associés à des transposons de même nature de type Tn3 [12,13]. La mobilité de ces plasmides et transposons contribuerait fortement à la diffusion interespèces de ces gènes KPC [14].

L'association des gènes KPC à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques sur de mêmes structures génétiques explique en grande partie la multirésistance de ces souches.

Tableau 2 : Principales carbapénémases des entérobactéries [15]

Classe d'Ambler	Enzyme	Plasmide/ Chromosome	Spectre hydrolytique					Inhibiteur	
			Pénicillines	C1G	C2G	C3G	Aztreonam carbapénèmes		
A	SME-1 à -3	Chromosome	++	++	-	+	+	+	Clavulanate, Tazobactam, Sulbactam,
	NMC-A	Chromosome	++	++	-	+	-	++	
	IMI-2	Plasmide	++	++	-	+	-	++	
	GES-4,-5,-6	Plasmide	++	++	+	+	-	+	
	KPC-2 à-12	Plasmide	++	++	-	++	+	++	Clavulanate, Tazobactam, Sulbactam, Acide boronique
B	IMP-1 à -33		++	++	++	-	-	++	EDTA
	VIM-1à -33		++	++	++	-	-	++	
	NDM-1 à -6		++	++	++	-	-	+	
	KHM-1		++	++	++	-	-	++	
D	OXA-48		++	++	+/-	-	-	+	NaCL
	OXA-181		++	++	+/-	-	-	+	

+ / ++ : indiquent l'activité hydrolytique ; (-) : pas d'hydrolyse détectable

2. Carbapénémases de classe D ou oxacillinases

D'après les résultats obtenus dans notre étude, les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont été isolées chez des patients ayant transité préalablement dans un service de chirurgie avant leur arrivée en service de réanimation et la réalisation ainsi du prélèvement. Ceci, soulève l'hypothèse d'une contamination nosocomiale, ce qui concorde avec les données de la littérature qui montrent que depuis la première description en 2009 par Benouda et al [16] du premier cas au Maroc de *K. pneumoniae* OXA-48 positive, ce mécanisme de résistance aux carbapénèmes a connu une dissémination nosocomiale importante à travers diverses espèces bactériennes, suggérant un état endémique.

En effet, des études rapportent des cas d'entérobactéries OXA-48 positives chez des patients transférés dans différents hôpitaux en France et en Belgique après un séjour hospitalier au Maroc [17, 18].

Les β -lactamases de classe D ou oxacillinases sont un groupe de 232 enzymes dont peu possèdent une activité carbapénémase. A l'exception du variant OXA-163, leur action n'affecte pas les céphalosporines de 3ème génération. Leur action carbapénémase intrinsèque est faible et non inhibée par les inhibiteurs de β -lactamases ou l'EDTA. Elle est inhibée par NaCl (tableau 2) [19].

Ces enzymes hydrolysent les aminopénicillines, les carboxypenicillines, et seulement partiellement l'imipénème malgré une grande affinité de l'enzyme pour ce substrat. Leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. En l'absence d'autres mécanismes de résistance (autres β -lactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porines, ou pompes à efflux), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes. De plus, l'hydrolyse des céphalosporines est quasi-inexistante [19].

L'enzyme OXA-48 a été identifiée initialement à partir d'une souche de *K. pneumoniae* isolée en Turquie, il y a une dizaine d'années [10]. Depuis, les entérobactéries OXA-48 positives connaissent une distribution mondiale, elles ont été rapportées en Europe, en Afrique et dans le pourtour méditerranéen [10].

Quant au phénotype isolé dans notre étude, il s'agit d'un Oxa 48, ce qui est comparable aux données de la bibliographie [10]. En effet, ce phénotype est le plus répandu dans l'Afrique du Nord. Une étude moléculaire pourrait être nécessaire pour confirmer ce résultat, en effectuant la technique de PCR qui va permettre d'amplifier et de révéler les gènes qui codent pour cette classe de Carbapénèmases Oxa48.

Le réservoir naturel de ce gène a été identifié, il s'agit de *Shewanella*, Ce qui suggère le transfert de ce gène de résistance en milieu aqueux [14, 20].

3. Carbapénémases de classe B ou métallo- β -lactamases

Les métallo-b β -lactamases ont un large spectre d'activité et hydrolysent toutes les β -lactamines en dehors de l'aztréonam. Les niveaux de résistance aux carbapénèmes sont assez variables [3]. Leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA (éthylène diamine tétra-acétate), qui chélate les cations bivalents dont les ions zinc présents au niveau du site actif de ces MBL.

Les premières MBL identifiées (BCII, CcrA, CphA et L1) étaient des enzymes chromosomiques présentes chez des bactéries de l'environnement ou des pathogènes opportunistes comme *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp, *S. maltophilia* ou *Bacteroides fragilis* [21-22]. Il s'agit des β -lactamases de types VIM, NDM, GIM. Les enzymes de types VIM et IMP sont les plus répandues. Leur hôte le plus habituel est *K. pneumoniae* et les niveaux d'expression de la résistance sont variables [21]. L'utilisation de différents types de β -lactamines et de quinolones a pu favoriser l'émergence de ces souches [23]. Les facteurs de risque qui favorisent la sélection de ces souches sont ceux, classiques, de la sélection de résistance aux antibiotiques en milieu nosocomial : immunodépression, hospitalisation en service de soins intensifs, pose d'un cathéter, prescription d'antibiotiques [23]. Plusieurs épidémies de souches d'entérobactéries productrices de ce type de carbapénémases ont été identifiées, notamment au Japon, en Italie, en Espagne et en Grèce [21,23]. L'Europe du Sud contribue fortement à la diffusion de ces marqueurs de résistance (VIM-1 notamment) [23]. Ici également, les vecteurs de dissémination sont tantôt les souches elles-mêmes, tantôt les plasmides et les gènes, eux-mêmes étant le plus souvent associés à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques (aux aminosides notamment) ou à des structures génétiques particulières, comme des intégrons.

Cette organisation génétique explique la multirésistance des souches qui peuvent émerger sous l'effet d'une pression de sélection antibiotique variée. Les niveaux de résistance aux

carbapénèmes sont en général élevés, notamment chez *K. pneumoniae*, mais ils peuvent varier.

Récemment, une nouvelle MBL transférable, NDM-1, a été décrite chez les entérobactéries, principalement *E. coli* et *K. pneumoniae*, en Inde et au Pakistan, mais également en Europe (Suède, Royaume-Uni, France, Pays-Bas, Allemagne), aux États-Unis, au Canada, en Australie, au Kenya, au sultanat d'Oman, et à Hong-Kong [9-24].

Actuellement, on note l'émergence d'entérobactéries (*K. pneumoniae*) productrices de NDM-1 au Maroc [25, 26].

4. Prise en charge des infections à entérobactéries productrices de carbapénémases

a) Screening des carbapénémases

A travers cette étude, il nous semble que la prévalence des entérobactéries productrices de carbapénémases considérées comme « hautement résistantes » est largement sous-estimée au Maroc. Ceci constitue un risque de santé publique.

D'où la nécessité de la mise en place d'une politique de détection, de prise en charge, de déclaration, de prévention et de surveillance de ces mécanismes de résistance.

Concernant la recherche d'entérobactéries productrices de carbapénémases, il n'existe pas actuellement de milieu qui soit à la fois très sensible et très spécifique. En pratique, dans l'état actuel des connaissances, il est recommandé d'ensemencer le prélèvement (écouvillon rectal et prélèvement des selles) sur un milieu pour recherche de BLSE et de réaliser une identification et un antibiogramme incluant les disques d'ertapénème et d'imipénème sur les colonies ayant poussé sur le milieu BLSE. L'utilisation de ces milieux de culture est basée sur le fait que les carbapénémases de type KPC comme les métallo- β -lactamases hydrolysent les C3G. Ces milieux permettraient une détection des deux types de carbapénémase les plus couramment recherchées (KPC, VIM/IMP). Dans le cas d'OXA-48 qui n'hydrolyse pas les C3G, la détection des souches de *K. pneumoniae* OXA-48 (+) peut être faite avec ces milieux de détection des producteurs de BLSE si ces souches produisent simultanément une BLSE (SHV, CTX-M, etc.), ce qui n'est pas toujours le cas.

Qu'elle soit isolée dans des prélèvements à visée diagnostique ou dans le cadre d'un dépistage, toute souche de sensibilité diminuée aux carbapénèmes doit bénéficier d'une analyse phénotypique, puis moléculaire des mécanismes de résistance dans un laboratoire spécialisé.

Le dépistage est basé sur la réduction de la susceptibilité aux carbapénèmes des isolats producteurs de carbapénémases. Les seuils de dépistage doivent répondre aux critères de l'EUCAST et du CLSI [41]:

Tableau3 : Valeurs seuils (CMI en mg/L) pour les carbapénèmes selon les guidelines Européens (EUCAST) et américains (CLSI), Septembre 2010*

Carbapenem	EUCAST		CLSI new	
	S	R	S	R
Ertapenem	≤ 0,5	> 1	≤ 0,25	≥ 1
Imipenem	≤ 2	> 8	≤ 1	≥ 4
Meropenem	≤ 2	> 8	≤ 1	≥ 4

*EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

(www.eucast.org/clinical_breakpoints); CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute;

S: sensitive; R: resistant.

b) Mesures de prévention

Il s'agit de mesures communes de prévention de la diffusion par transmission croisée de bactéries multirésistantes (BMR). Cette prévention repose sur deux types de mesures, l'identification précoce et l'isolement des patients porteurs.

ü Utilisation optimale des antibiotiques

L'usage optimal des antibiotiques est un élément incontournable d'un programme de prévention de l'émergence de la résistance bactérienne.

Il s'agit là de la première action à réaliser pour réduire la pression sélective générée par l'utilisation des antibiotiques.

Dans les milieux de soins, la mise en place d'un programme de surveillance de l'usage des antibiotiques accompagné de guides cliniques et d'activités de formation continue sont des éléments qu'il est souhaitable d'implanter.

ü Identification des patients porteurs de BMR

L'identification des patients porteurs de BMR est primordiale, car c'est elle qui permet de mettre en œuvre les mesures d'isolement. Cette identification concerne :

- Les patients déjà connus pour être porteurs, et signalés d'emblée à l'admission (ex : fiche de liaison, utilisation des systèmes d'information hospitalière, mention par le patient lui-même et son entourage).
- Les patients pour lesquels une carbapénémase a été mise en évidence à partir de prélèvements à visée diagnostique ou à partir de prélèvements de dépistage.

L'identification des patients porteurs de BMR comprend :

- La détection de la multirésistance au laboratoire
- La signalisation des patients porteurs de BMR dans le service d'hospitalisation qui permet d'indiquer de façon explicite, à chacun des acteurs de soins, les précautions particulières pour la prise en charge de ces patients.

La mise en place d'un système d'information relatif au portage de BMR, permettant de reconnaître ces patients lors d'une nouvelle hospitalisation afin que les mesures requises soient mises en place. Les mécanismes d'identification proposés sont :

- Alerte mentionnant le statut de porteur dans le système informatique d'admission;
- Alerte inscrite sur le dessus, à l'intérieur de chacun des tomes du dossier médical ;
- L'identification du statut de porteur doit demeurer inscrite dans le dossier médical du patient et dans le système informatique jusqu'à indication contraire du service de prévention des infections, après l'analyse du dossier.

ü Précaution d'isolement

Il s'agit d'un isolement technique et géographique.

L'isolement technique est indispensable. Il vise à instituer une barrière physique autour d'un patient porteur pour éviter la dissémination des BMR. L'organisation du service doit être conçue pour faciliter l'application des mesures d'isolement technique : signalisation, équipement et organisation du travail notamment pour éviter l'interruption des soins. Pour être acceptées, les mesures d'isolement technique doivent être expliquées au patient et à son entourage. L'isolement technique repose sur :

- le lavage antiseptique (hygiénique) des mains après contact avec le patient porteur.

- le port de gants à usage unique non stériles lors de tous les contacts particulièrement contaminants avec le patient porteur, et dans certains cas, avec son environnement immédiat. Ils doivent être ôtés dans la chambre. L'utilisation de gants ne dispense en aucun cas du lavage des mains après le contact.
- le port de tablier lors de soins particulièrement contaminants ou exposant à un contact large avec le patient.
- l'utilisation de matériel de soins réservé à chaque patient porteur de BMR (matériel de toilette, tensiomètre, stéthoscope, petit matériel de soin...).
- la gestion rigoureuse des déchets qui doivent être gardés dans la chambre jusqu'à leur évacuation rapide selon la filière réglementaire habituelle.
- Le traitement adéquat (incinération) des excréta et déchets de patients infectés ou colonisés.

L'isolement géographique facilite considérablement l'application des mesures d'isolement technique. Il se fait en chambre individuelle ou à défaut en chambre à plusieurs lits regroupant des patients porteurs du même type de BMR. Lorsque plus de deux patients sont reconnus porteurs, ceux-ci sont regroupés, soit au sein de l'unité elle-même dans une ou plusieurs chambres formant un secteur, soit dans une unité spécifique. Le personnel médical et paramédical affecté aux patients ainsi regroupés doit si possible être distinct de celui affecté aux autres patients. Dans le cas contraire, les soins et les visites médicales sont assurées en allant du « secteur non BMR » au « secteur BMR ».

CONCLUSION

En conclusion, on peut déduire que les services de réanimation sont fréquemment des réservoirs de patients porteurs de germes résistants, considérés donc comme des concentrateurs de résistance bactérienne. Il n'est donc pas surprenant que la fréquence des patients colonisés/infectés par des carbapénémases soit plus élevée en réanimation et donc que la réduction des taux et de la transmission croisée dans ce type de service soit une priorité pour l'établissement de soins.

D'après les résultats obtenus dans notre étude, les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont été isolées chez des patients ayant transité préalablement dans un service de chirurgie avant leur arrivée en service de réanimation et la réalisation ainsi du prélèvement. Ceci, soulève l'hypothèse d'une contamination nosocomiale.

La présence de souches environnementales d'entérobactéries OXA-48 positives constitue une vraie menace de péril sanitaire et pourrait avoir un impact socio-économique délétère sur les destinations touristiques marocaines. Ce constat impose la mise en place urgente d'une politique globale de dépistage et de prise en charge des bactéries multirésistantes aussi bien dans les structures hospitalières qu'en médecine communautaire et dans le milieu environnemental.

Les carbapénémases sont le plus souvent associées à des résistances à d'autres familles d'antibiotiques contribuant à la multirésistance aux antibiotiques de ces souches. Une fois établie, cette multirésistance ne régresse pas facilement. Le risque d'impasses thérapeutiques est réel surtout qu'il n'existe pas de perspectives proches de mise sur le marché de nouveaux antibiotique anti-gram négatif et que de nouvelles carbapénémases ont une activité hydrolytique encore plus étendue vis-à-vis des carbapénèmes.

RESUME

RESUME

Introduction

Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes est due principalement à deux mécanismes. Le premier associe la production d'une céphalosprinase ou d'une BLSE à une diminution de la perméabilité membranaire par perte ou altération de porines. Le second mécanisme met en jeu des enzymes capables d'hydrolyser fortement ces molécules. Ces enzymes sont appelées carbapénémases et appartiennent aux classes A, B et D du système d'Ambler. Sur le plan clinique, ce mécanisme de résistance est plus important. Il implique le plus souvent une résistance à l'ensemble des β -lactamines. De même, il est stable et survient chez des souches résistantes aux autres familles d'antibiotiques. Par ailleurs, le support souvent plasmidique des gènes codant pour ces enzymes rend leur diffusion plus large et leur maîtrise d'autant plus complexe.

Le but de ce travail est d'étudier l'état des lieux concernant les entérobactéries productrices de carbapénémases et leur émergence aux services de réanimation du CHU Hassan II de Fès, puis faire le point sur les outils de détection et de confirmation nécessaires à la mise en évidence des carbapénémases chez les entérobactéries.

Patients et méthodes

Il s'agit d'une étude prospective portant sur 100 malades colligés au sein des différents services de réanimation du CHU Hassan II de Fes sur une période de 10 mois.

Les prélèvements rectaux sont acheminés directement au laboratoire de microbiologie.

L'identification des bactéries était faite par les techniques bactériologiques usuelles notamment en utilisant les galeries API 20E et parfois en ayant recours à l'automate d'identification Phoenix.

La susceptibilité aux antibiotiques était réalisée par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton. Différents antibiotiques, β -lactamines et non β -lactamines ont été testés. Les résultats étaient interprétés selon les recommandations du CA-SFM. Les concentrations minimales inhibitrices « CMI » étaient déterminées pour l'Ertapénème en utilisant la technique des E-tests.

Le screening des souches positives s'est fait par des techniques phénotypiques (test de hodge, tests d'inhibition, tests de synergie...).

Résultats

Les carbapénémases identifiées dans notre étude appartenaient à la classe D (n=4) de la classification d'Ambler dont le phénotype est Oxa 48.

Conclusion

A travers cette étude, il apparaît que le Maroc est probablement une zone endémique d'entérobactéries porteuses des carbapénémases OXA-48. Ce constat impose la mise en place urgente d'une politique globale de dépistage et de prise en charge des bactéries multirésistantes aussi bien dans les services de réanimation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:82-9
- [2] Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:659-67.
- [3] P. Nordmann, A. Carrer, Les carbapénèmases des entérobactéries, *Archives de Pédiatrie* 2010; 17: S154-S162
- [4] Lee K, Yong D, Choi YS, et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 beta-lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:201-6
- [5] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-58.
- [6] Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007;2:501-12.
- [7] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791- 1798.
- [8] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9: 228-36.

- [9] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046-54.
- [10] Poirel L, Héritier C, Tolun V, et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15-22.
- [11] Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid from Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1369-73.
- [12] Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 67, 593-656
- [13] Lavigne, J.P. et al.(2011) Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clin.Microbiol. Infect.* DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.
- [14]Cuzon, G. et al. (2010) Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1349-1356
- [15] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S ;Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin Microbiol*2005; 43: 4178-4182.

[16] A. Benouda, O. Touzani, M.-T.Khairallah, G. F. Araj, G. M. Matar ; First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco; *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, (2010)Vol. 000, No. 000, 1–4

[17] Laurent poirel, alain ros, améliecarrer, nicolasfortineau, annecarricajo, philippeberthelot, patrice nordmann. OXA-48 producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France.*Journal of antimicrobial chemotherapy*.

[18]Youriglupczynski et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39 (2012) 168-172.

[19] Patrice Nordmann, Laurent Dortet and Laurent Poirel ;Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!; *Trends in Molecular Medicine* Vol xx (2012) 1–10 Article In Press

[20] Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother*2004; 48: 348-51.

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

[22] Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P, Fortineau N, Poirel L. VIM-19, a metallo-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 ; 54 : 471-6.

[23] Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gramnegatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010 ; 16 : 102-11.

[24] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010 ; 10 : 597-602.

[25] Nordmann, P. et al. (2011) Does broad-spectrum resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment caused by Gram negative bacteria? *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 689–692

[26] Nordmann, P. et al. (2011) Emergence of an autochthonous NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clin. Infect. Dis.* DOI: 10.1093/cid/cir720