



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

**UNIVERSITE DE LORRAINE  
2015**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE  
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de Biologie  
médicale**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 21 octobre 2015

Par REGNAULT Loïc  
né le 09/07/1988 à Laxou (54)

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

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

---

Titre

**Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques des  
bactéries anaérobies isolées d'hémocultures au CHU de  
Nancy en 2010 et en 2014**

---

Membres du Jury

Président : Monsieur le Professeur Christophe GANTZER

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Alain LOZNIEWSKI

Juges : Madame le Docteur Janina FERRAND  
Madame le Docteur Christelle FABBRO

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2015-2016**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Béatrice FAIVRE

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Conseil de la Pédagogie**

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Président, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Président, Raphaël DUVAL

**Responsable de la filière Officine  
Responsables de la filière Industrie**

Béatrice FAIVRE  
Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS  
Béatrice DEMORE  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS  
Raphaël DUVAL  
Marie-Paule SAUDER  
Béatrice FAIVRE

**Responsable de la filière Hôpital  
Responsable Pharma Plus ENSIC  
Responsable Pharma Plus ENSAIA  
Responsable de la Communication  
Responsable de la Cellule de Formation Continue  
et individuelle  
Responsable de la Commission d'agrément  
des maîtres de stage  
Responsables des échanges internationaux  
Responsable ERASMUS**

Béatrice FAIVRE  
  
Bertrand RIHN  
Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON  
Jean-Claude BLOCK  
Max HENRY  
Gérard SIEST  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY  
Pierre DIXNEUF  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Thérèse GIRARD  
Michel JACQUE  
Pierre LABRUDE  
Lucien LALLOZ  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT  
Marianne BEAUD  
Gérald CATAU  
Jean-Claude CHEVIN  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Francine KEDZIEREWICZ  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Jean-Louis MONAL  
Blandine MOREAU  
Dominique NOTTER  
Christine PERDICAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ENSEIGNANTS**

Section CNU\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY ☞	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i> <i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>
Olivier JOUBERT	86	

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY ☒	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
<b>PROFESSEUR ASSOCIE</b>		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
<b>MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE</b>		
Alexandre HARLE ☒	82	Biologie cellulaire oncologique
<b>PROFESSEUR AGREGE</b>		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

☒ En attente de nomination

\*Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



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

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

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

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

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

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



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

# REMERCIEMENTS

**A mon Président de Thèse, Monsieur le Professeur Christophe Gantzer,**

*Professeur de Microbiologie Environnementale à la Faculté de Pharmacie*

Pour l'honneur que vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet. Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma reconnaissance.

**A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Alain LOZNIIEWSKI,**

*Professeur de Bactériologie au CHU de NANCY et à la Faculté de Médecine*

Vous me faites le très grand honneur d'encadrer et de juger ce travail.

Je vous remercie pour votre accueil dans votre laboratoire et de vos conseils durant ma formation.

Veillez accepter mes remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance

**Aux membres du jury :**

**A Madame Janina Ferrand,**

*Assistante hospitalo-universitaire dans le laboratoire de Bactériologie du CHU de NANCY*

Pour tes précieux conseils, tes corrections très détaillées et ton implication tout au long de ce travail. Je te remercie également pour ta disponibilité et ta gentillesse que j'avais aperçues lors de notre semestre en commun.

Trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

**A Madame Christelle Fabbro,**

*Praticienne hospitalière au CHR Metz-Thionville*

Pour avoir accepté de juger cette thèse et de siéger parmi les membres du jury. Merci pour l'accueil dans le laboratoire et pour les « trois petites choses » que tu m'auras appris durant ce semestre. J'ai également très apprécié nos nombreux échanges.



## **A ma famille**

### **A mes parents,**

Merci de la confiance et du soutien que vous m'avez apportés durant mes études. Je vous dois une très grande partie de ma réussite et je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez appris tout au long de la vie.

### **A ma sœur Elodie et Yannick,**

Merci pour toutes ces années où j'ai grandi à tes côtés et les souvenirs qui les accompagnent. Je te souhaite tout le bonheur du monde avec Yannick et les petites pounettes.

### **A ma famille,**

Mon grand-père, mon parrain, ma marraine, mes oncles, mes tantes, cousins, cousines pour les bon moments familiaux.

### **A Lucille,**

Pour avoir régulé ton... enfin mon stress ! Merci pour tout ce que tu es tous les jours. Faisons encore un bout de chemin ensemble... Enfin on verra ;)

## **A mes amis**

### **A mes amis de lycée et d'avant,**

A Romain, Gatien, Céline, Lisa...pour tous les souvenirs de Prévert, de Monod, de Stan', de TS2 beubeu (dix ans l'année prochaine !) et de Cassis à Llançà !

### **A mes amis de fac,**

Que ce soit tous les mecs ou toutes les filles, merci pour les olympiades, les nombreuses soirées et les vacances...mais aussi :

A Pierre pour le sapin

A Seb pour son canapé

A Toto pour mes tétons

A Mike pour le 230

A Bertrand pour ton aspiration dans les schuss

A Paul pour les kiss cool

A Xav' pour son sabrage de champagne

A Javier le hattrickien bordelais en 5-3-2

A Alex pour ces discussions infinies sur le sport, on a pas fini d'en rigoler

### **Aux internes,**

A Alain,

Bien sûr il y a eu l'initiation au vin mais également le sourire et l'ambiance que tu amènes à chaque soirée. Merci pour la générosité dont tu fais preuve à tout moment, on ne compte plus tes invitations dans ton appartement pour terminer les soirées. On n'oubliera pas aussi nos nombreuses discussions sur Metz ainsi ton œil de lynx...Merci président !

A Julien,

Le producteur, le réalisateur, le metteur en scène et l'acteur de toutes les soirées de l'internat. Merci, c'est grâce à toi qu'on aura tous ces souvenirs immortalisés : les soirées improvisées, les discussions post-soirées dans la clio, les séances du lundi qui vont me manquer, surtout les vestiaires ;-)

A Arnaud,

Ton sourire résume ta personnalité. Merci pour les organisations de soirées et de vacances. Même à la dernière minute, on te suivrait partout. Il y aura toujours un canapé et un plat de pâtes pour t'accueillir chez moi. Mec, on va à la Masse ?!

Aux autres internes,

A Marie dont les expressions de la Haute-Saône m'auront accompagné plusieurs semestres..... A Alexandra mon souffre-douleur préféré (note le compliment) que je remercie pour ses présentations en hémato et sa présence aux soirées, à Lucile qui m'aura bien fait rigoler avec ses jugements hâtifs et sa personnalité du Sud (courage c'est bientôt terminé). Aux joueurs de Jorky : à Briec, maître incontesté de l'organisation, à Brice, compétiteur hors norme, à Alexandre, top player, à Rémy pour ta gestuelle footballistique...

Aux bébés niveau 1 de bactério qui ont bien respecté leur aîné ;-)  
A tous les autres que je n'ai pas cités mais que je remercie pour toutes les soirées communes, on était une bonne équipe d'internes.

**Aux équipes dans les laboratoires,**

Merci pour votre accueil et pour avoir participé à ma formation durant tout mon internat.

## Table des matières

Table des tableaux .....	1
Table des figures .....	2
Introduction .....	4
I. Généralités sur les bactéries anaérobies .....	5
A. Définition.....	5
B. Habitat .....	6
1. Flore exogène.....	6
2. Flore endogène.....	6
C. Pouvoir pathogène .....	8
1. Physiopathologie.....	8
2. Infections liées aux anaérobies .....	9
II. Les bactériémies à anaérobies .....	13
1. Une épidémiologie changeante ? .....	13
2. Facteurs de risque .....	14
3. Mortalité.....	16
4. Diagnostic microbiologique.....	17
III. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies .....	21
A. Quand évaluer la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies ?.....	22
B. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies .....	22
1. Définitions.....	22
2. Standardisation.....	23
3. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques .....	25
C. Etat des lieux de la résistance antibiotique des bactéries anaérobies .....	37
1. Résistances naturelles .....	37
2. Résistances acquises .....	39
I. Objectifs .....	56

II. Matériels et méthodes.....	56
A. Données bio-cliniques .....	56
B. Hémocultures et méthodes d'identification des isolats .....	57
C. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats.....	58
2. Recherche de $\beta$ -lactamase.....	60
3. Détermination des CMI.....	60
4. Détection des gènes de résistance .....	61
D. Etude statistique.....	61
III. Résultats .....	62
A. Epidémiologie locale des hémocultures à bactéries anaérobies .....	62
B. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies .....	65
IV. Discussion .....	71
Conclusion.....	77
BIBLIOGRAPHIE .....	78
<b>RESUME :</b> .....	92

## Table des tableaux

Tableau 1. Concentration bactérienne selon les sites anatomiques et rapport bactéries anaérobies/bactéries aérobies. ....	7
Tableau 2. Infections impliquant les bactéries anaérobies. ....	11
Tableau 3. Articles (1998-2015) rapportant l'incidence des bactériémies à anaérobies .....	14
Tableau 4. Principales sources des bactériémies à bactéries anaérobies.....	15
Tableau 5. Principales espèces anaérobies impliquées dans les bactériémies selon la source.	19
Tableau 6. Signification clinique des bactériémies à anaérobies .....	20
Tableau 7. Concentrations critiques EUCAST,CLSI et CA-SFM de pour la pénicilline G, la pipéracilline-tazobactam et le métronidazole .....	24
Tableau 8. Espèces anaérobies chez lesquelles une production de $\beta$ -lactamase a été mise en évidence.....	34
Tableau 9. Résistances naturelles des bactéries anaérobies .....	38
Tableau 10. Phénotypes et fréquence de résistance aux $\beta$ -lactamines des <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> .....	41
Tableau 11. Niveau de résistance aux carbapénèmes de souches de <i>B.fragilis</i> dans le monde	45
Tableau 12. Diamètres critiques de catégorisation clinique des antibiotiques étudiés .....	59
Tableau 13. Concentrations critiques de catégorisation clinique du CA SFM 2013. ....	61
Tableau 14. Caractéristiques de la population en 2010 et 2014.....	62
Tableau 15. Répartition de l'origine des services des patients. ....	63
Tableau 16. Bactéries anaérobies isolées dans les flacons d'hémocultures en 2010 et en 2014. ....	64
Tableau 17. Caractéristiques des bactériémies polymicrobiennes .....	65
Tableau 18. Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques de différents groupes de bactéries anaérobies isolées d'hémocultures en 2010 et en 2014.....	66
Tableau 19. Sensibilité au métronidazole des souches de 2010 et 2014.....	69
Tableau 20. CMI des carbapénèmes de trois souches de <i>B. fragilis résistantes à l'imipénème</i> et présence du gène <i>cfiA</i> .....	70

## Table des figures

Figure 1. Principales bactéries anaérobies des flores commensales. ....	8
Figure 2. Inoculateur de Steers pour l'ensemencement de plusieurs souches bactériennes ....	26
Figure 3. Série de géloses contenant trois concentrations différentes d'antibiotique .....	26
Figure 4. Pipette Sensititre® pour distribution dans une microplaque .....	27
Figure 5 Système Spiral® .....	29
Figure 6. Etest (bioMérieux ) .....	30
Figure 7. Galerie ATB ANA® .....	31
Figure 8. PCR multiplex détectant les principaux gènes de résistance de <i>B. fragilis</i> .....	36
Figure 9. Etude de l'hydrolyse de l'ertapénème par la SM MALDI TOF. ....	37
Figure 10. Distribution des CMI de l'ampicilline chez des souches de <i>Bacteroides</i> selon la présence ou l'absence du gène <i>cepA</i> .....	41
Figure 11. Distribution des CMI de la céfoxitine chez des souches de <i>Bacteroides</i> selon la présence ou l'absence du gène <i>cfxA</i> .....	43
Figure 12. Distribution des CMI du métronidazole chez des souches <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> selon la présence ou l'absence du gène <i>nim</i> .....	46
Figure 13. Fréquence de la résistance aux antibiotiques des principaux anaérobies à Gram négatif hors <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> en France .....	49

# Liste des abréviations

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

CGPA : Cocci à Gram positif anaérobies

UFC : Unité formant colonies

PLP : Protéines liant pénicillines

ADN : Acide désoxyribonucléique

PCR : *Polymerase chain reaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)



## Introduction

Les bactéries anaérobies font partie des flores commensales endogènes de l'Homme et sont responsables de nombreuses infections dont certaines sont très sévères comme les bactériémies.

Les bactéries anaérobies représentaient dans les années 1980 une part importante des bactériémies. Des auteurs ayant noté une diminution des bactéries anaérobies dans ces infections ont alors suggéré de supprimer leur recherche. Cependant, les études épidémiologiques concernant les bactériémies à anaérobies sont contradictoires. Actuellement il est cependant clairement établi qu'elles représentent une part non négligeable des bactériémies, qu'elles touchent des populations fragiles et que le taux de mortalité qui leur est imputé reste élevé.

La recherche de ces bactéries dans les divers prélèvements biologiques est fastidieuse et difficile en raison de leur sensibilité à l'oxygène. L'étude de leur sensibilité aux antibiotiques n'est que rarement réalisée en routine dans les laboratoires de biologie médicale. Ceci explique que le traitement des infections à bactéries anaérobies est souvent empirique. Cette stratégie thérapeutique peut cependant conduire à des échecs thérapeutiques en raison de l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques utilisés de manière probabiliste. Ainsi, certaines souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont devenues résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines ou au métronidazole, qui reste la molécule anti-anaérobie la plus utilisée dans le monde. La fréquence de la résistance aux antibiotiques des principales espèces bactériennes anaérobies impliquées dans les infections humaines est cependant variable dans le temps et l'espace. Afin de s'assurer que les schémas thérapeutiques probabilistes demeurent adaptés, il est nécessaire qu'une surveillance régulière de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques des principales espèces de bactéries anaérobies soit réalisée à l'échelle loco-régionale et nationale. Il est également nécessaire de s'assurer que chez les patients ayant une infection sévère, les bactéries anaérobies impliquées soient bien sensibles aux antibiotiques prescrits. Dans le cas contraire, les résultats de l'antibiogramme doivent permettre une adaptation de l'antibiothérapie.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies responsables de bactériémies, qui représentent une fraction importante des infections sévères dans lesquelles ces microorganismes sont impliqués.

Dans un premier temps, les généralités concernant les bactéries anaérobies et les bactériémies dues à ces microorganismes seront abordées. En second lieu, les différentes méthodes permettant d'étudier la sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques seront détaillées. Notre travail personnel sera présenté dans la dernière partie. Il s'agit d'une étude rétrospective ayant pour but de comparer i) les caractéristiques sociodémographiques et hospitalières des patients hospitalisés au CHRU de Nancy, ayant eu une bactériémie à anaérobies en 2010 et en 2014 et ii) et celles des isolats correspondants (espèces, résistance aux antibiotiques).

## I. Généralités sur les bactéries anaérobies

### A. Définition

Les bactéries anaérobies sont des bactéries incapables de se développer dans une atmosphère riche en oxygène. Elles sont incapables d'utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Elles tirent donc leur énergie de réactions de fermentation dans lesquels les accepteurs d'électrons sont le plus souvent des composés d'origines organiques (1).

Le degré de sensibilité à l'oxygène est variable selon les espèces. En microbiologie clinique on distingue (1,2) :

- **les anaérobies strictes** incapables de se développer à une concentration d'oxygène supérieure à 0,1-0,5 % (ex : *Fusobacterium nucleatum*),
- **les anaérobies modérées** ne se multipliant pas à une concentration en oxygène supérieure à 2-8% (ex : *Bacteroides* du groupe *fragilis*),
- **les anaérobies aérotoleérantes** pouvant se développer en air ambiant mais moins rapidement qu'en anaérobiose (ex : *Clostridium tertium* et *Propionibacterium acnes*).

## **B. Habitat**

Les bactéries anaérobies font partie de la flore endogène des hommes et des animaux. Certaines espèces sont également retrouvées dans l'environnement sous forme de spores. On distingue ainsi deux groupes de bactéries anaérobies : (1) la flore exogène et (2) la flore endogène (flore de Veillon).

### **1. Flore exogène**

Les espèces anaérobies sont fréquemment retrouvées au niveau du sol et des eaux douces et salées. Il s'agit essentiellement de bactéries appartenant au genre *Clostridium* survivant dans l'environnement sous forme sporulée. Elles ont un rôle pathogène opportuniste qui s'exprime si elles disposent d'une porte d'entrée lors d'une effraction cutanée (blessure, brûlure) ou, plus rarement, par voie digestive, en profitant de circonstances favorables locales (antibiothérapie, immunodépression...). Les bactéries le plus souvent impliquées sont : *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile*. Leur pouvoir pathogène s'exprime en grande partie ou essentiellement via la production des toxines.

### **2. Flore endogène**

Les bactéries anaérobies constituent une proportion importante des flores commensales colonisant la peau et les muqueuses (Tableau 1). Les principales espèces bactériennes d'intérêt clinique retrouvées dans les divers sites anatomiques sont répertoriées dans la Figure 1.

**Tableau 1. Concentration bactérienne selon les sites anatomiques et rapport bactéries anaérobies/bactéries aérobies[d'après (3)].**

	Nombre de bactéries / g ou mL	Rapport anaérobies/aérobies
<b>Bouche</b>		
salive	$10^8-10^9$	1/1
cavité dentaire	$10^{10}-10^{11}$	1/1
sillon gingival	$10^{11}-10^{12}$	1000/1
<b>Tractus gastro intestinal</b>		
estomac	$10^2-10^5$	1/1
intestin grêle	$10^2-10^4$	1/1
iléon	$10^4-10^7$	1/1
colon	$10^{11}-10^{12}$	1000/1
<b>Vagin</b>	$10^8-10^9$	3 à 5/1

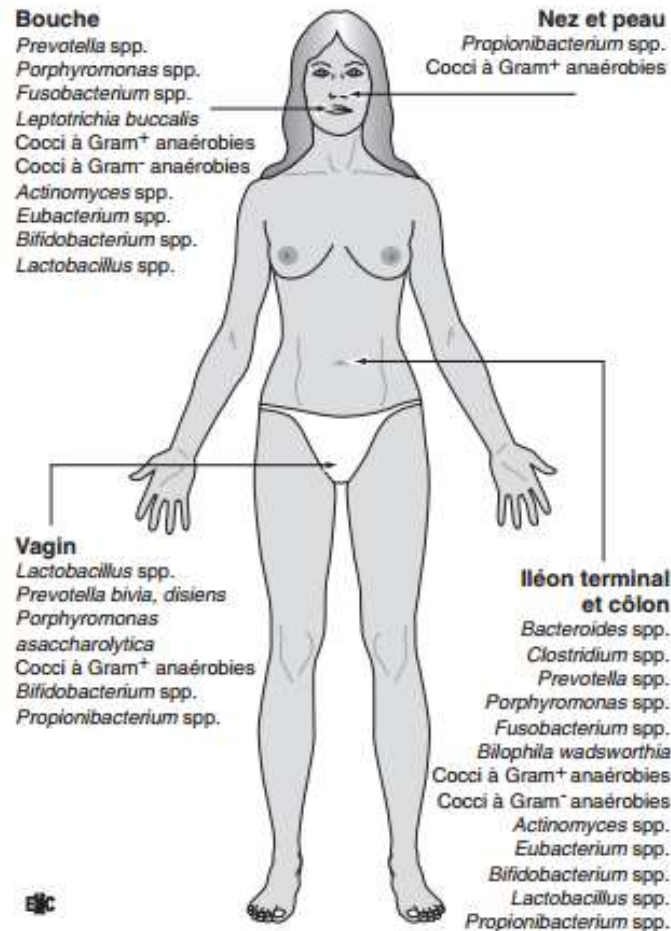


Figure 1. Principales bactéries anaérobies des flores commensales [d'après (3)].

La présence de bactéries anaérobies au niveau des flores commensales du vagin et du tractus intestinal s'explique par la faible concentration en oxygène dans ces régions. Concernant les autres sites exposés en continu à l'air, la survie des bactéries anaérobies est liée à l'existence des micro-habitats protégés de l'air (ex : sillon gingival) et à la cohabitation avec des bactéries aérobies qui consomment l'oxygène dans leur métabolisme (4).

## C. Pouvoir pathogène

### 1. Physiopathologie

Habituellement, la présence des bactéries anaérobies est limitée aux sites colonisés, où elles font partie des barrières protectrices limitant l'implantation des pathogènes exogènes. Cependant, certaines situations peuvent favoriser le déplacement des bactéries anaérobies vers

des tissus voisins (normalement stériles), ce qui entraîne une infection locale (5). A partir de ce foyer primitif, elles peuvent diffuser par voie sanguine et générer des foyers secondaires en cas de conditions favorables (5). Les principaux facteurs favorisant les infections opportunistes à bactéries anaérobies sont (8-15) :

- un traumatisme ou un acte chirurgical affectant les habitats naturels des bactéries anaérobies (tractus digestif, voies génito-urinaires, tractus oro-pharyngé),
- tout facteur engendrant une diminution de la pression tissulaire en oxygène : hématome, ischémie locale, vasoconstriction, corps étranger, etc.,
- une déficience immunitaire quelle qu'en soit la cause (diabète, cancers solides, hémopathies, transplantation d'organe, VIH...),
- une antibiothérapie préalable (notamment pour les infections à *Clostridium difficile*...).

Dans ces conditions favorables, les bactéries anaérobies peuvent exprimer des facteurs de virulence, tels que (2, 6, 7) :

- des exotoxines produites par exemple par les *Clostridia* (e.g. toxines A et B de *C. difficile*, entérotoxines alpha et thêta de *C. perfringens*, neurotoxines de *C. botulinum* et *C. tetani*),
- des enzymes modifiant l'architecture tissulaire (collagénases, hyaluronidases...),
- des molécules d'adhésion (fimbriae, pili, agglutinines...),
- des facteurs de protection contre les défenses immunitaires de l'hôte (capsule, lipopolysaccharide...).

## 2. Infections liées aux anaérobies

Les bactéries anaérobies sont schématiquement responsables de deux types d'infections :

- les infections à *Clostridium* spp. sécréteurs de toxines,
- les infections opportunistes impliquant la flore anaérobie endogène.

Les toxines de *Clostridium* spp. peuvent être responsables d'intoxications, liées à l'ingestion d'une toxine préformée (ex : paralysie flasque due à la toxine produite par *Clostridium botulinum*). Les toxines produites par *Clostridium* spp. peuvent également être

responsable de lésions fonctionnelles (ex : paralysie spastique due à la toxine produite par *Clostridium tetani*) ou cellulaires et/ou tissulaires en rapport avec la multiplication *in situ* des bactéries (ex : *C. difficile* responsable de diarrhée post-antibiotique et de colite pseudo-membraneuse, *C. perfringens* provoquant une gangrène gazeuse).

Les infections impliquant la flore endogène sont souvent pluri-microbiennes, mixtes (impliquant des espèces autres que les bactéries anaérobies strictes), et se développent souvent, du moins dans un premier temps, au voisinage des muqueuses (e.g. suppurations digestives). Certains tableaux cliniques sont par ailleurs spécifiquement liés à certaines espèces anaérobies (ex : *Fusobacterium necrophorum* dans l'angine de Vincent et le syndrome de Lemierre).

Les principales infections impliquant les anaérobies sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Infections impliquant les bactéries anaérobies [d'après (2,5–12)].

Flore	Sites/ Infections	Fréquence d'isolement de bactéries anaérobies (%)	Principaux genres/espèces retrouvées
Microbiote bucco-dentaire	<b><u>Sphère ORL</u></b> Angine ulcéronécrotique (angine de Vincent...) Phlegmon amygdalien	80-90	<i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Prevotella</i> spp.
	Sinusites chroniques Otites moyennes chroniques	38-88 33-71	CGPA <i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp.
	<b><u>Infections dentaires</u></b> Gingivites Parodontites Abscess dentaires	90	<i>Prevotella intermedia</i> et <i>nigrescens</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Fusobacterium</i> spp.
	<b><u>Pleuro-pulmonaires</u></b> Pleurésie Pleuro-pneumopathie de déglutition Abscess du poumon	50 62-90 39-93	<i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. CGPA <i>Actinomyces</i> spp.
Microbiote digestif	<b><u>Infection digestives</u></b> Péritonites, appendicites, abscess ano-rectaux infections des voies biliaires, infections du périnée, abscess hépatiques	50-90	<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>Eggerthella lenta</i> CGPA <i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.
Microbiote vaginal	<b><u>Infections génitales</u></b> Pelvi-péritonites, salpingites, endométrites, chorioamniotites, avortements septiques	50	<i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Mobilincus</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. CGPA
Variable	<b><u>Abscess cérébraux</u></b>	50-90	<i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp. <i>P. acnes</i> <i>Clostridium</i> spp.



Flore	Sites/ Infections	Fréquence d'isolement de bactéries anaérobies (%)	Principaux genres/espèces retrouvées
	<u>Peau et tissus mous</u> Plaies post-opératoires, dermohypodermites avec fasciite nécrosante, myonécroses	90	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. CGPA <i>Fusobacterium</i> spp.
	<u>Ostéo-articulaires</u>	77	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Finegoldia magna</i> CGPA <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> <i>Fusobacterium</i> spp.
	<u>Bactériémies</u>	4	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. CGPA <i>Prevotella</i> spp. bacilles à Gram positif non sporulés anaérobies

## II. Les bactériémies à anaérobies

Les bactéries anaérobies représentent une cause importante des bactériémies avec une mortalité pouvant atteindre 60%. C'est pourquoi, leur diagnostic précoce et la mise en place d'un traitement adapté restent primordiaux.

### 1. Une épidémiologie changeante ?

Traditionnellement, les bactéries anaérobies étaient reconnues comme une cause importante de bactériémies. En effet, avant les années 80 leur fréquence d'isolement dans les hémocultures était estimé à 20-30% (13). Cependant, plus récemment, des données contradictoires ont été rapportées quant à l'incidence et l'impact clinique des bactériémies anaérobies (14). Certains auteurs ont noté une diminution de leur incidence (15). Il a été suggéré que cette décroissance pouvait être expliquée par une connaissance accrue des infections à bactéries anaérobies et leur meilleure prise en charge (16–18). D'autres auteurs ont constaté une stabilité (19) ou une augmentation d'incidence des bactériémies anaérobies (20,21) (Tableau 3). Il reste cependant difficile de tirer des conclusions de ces travaux puisqu'ils s'intéressaient à des populations restreintes de patients, souvent provenant d'une seule structure hospitalière (15,19). De plus, certaines de ces études incluaient dans l'analyse des contaminants potentiels (e. g. *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*) (22,23).

Actuellement, la proportion de bactériémies anaérobies est évaluée à 4% (0,5-9%) soit environ 1 cas pour 1000 admissions. Ce pourcentage est variable car il dépend des paramètres démographiques de la population, notamment de l'âge du patient et de ses comorbidités (immunodépression, cancers...), de l'activité de l'hôpital (chirurgie, gynécologie) et de la politique d'usage des antibiotiques (24). Seulement deux études récentes ont évalué l'incidence des bactériémies anaérobies par l'approche populationnelle permettant de s'affranchir des biais de sélection. La première retrouvait une incidence de 8,7 épisodes/100 000 habitants pour les années 2000-2008 dans la région de Calgary. La seconde notait 9,1 épisodes/100 000 habitants entre 2003-2012 dans la région madrilène (14,22). Cette dernière incidence correspondait à une proportion de bactériémies de 3,3% soit environ 1,2 cas pour 1000 admissions. Les auteurs ont rapporté une stabilité de cette proportion durant la période étudiée.

**Tableau 3. Articles (1998-2015) rapportant l'incidence des bactériémies à anaérobies**

Référence	Localisation	Période d'étude	Anaérobies isolées d'hémocultures positives (%)	Tendance dans l'incidence rapportée	Mortalité (%)
Salonen 1998 (23)	Hôpital Universitaire de Turku	1991-1996	4	Non	18 si antibiothérapie adaptée, 55 si antibiothérapie inadaptée
Blairon 2006 (21)	Hôpital Universitaire Mont-Godinne	1999-2005	3,3	Augmentation	13
Grohs 2007 (19)	Hôpital Georges Pompidou	2001-2004	5 en 2001 4,1 en 2004	Inchangée	/
Lassmann 2007 (20)	Clinique Mayo	1993-2004	5,4 en 1993 10,4 en 2004	Augmentation	/
Fenner 2008 (15)	Hôpital Universitaire de Bâle	1997-2006	0,95	Diminution	/
Ngo 2012 (22)	Région de Calgary	2000-2008	-	Non	20
Vena 2015 (14)	Hôpital Gregorio Maranon	2003-2012	3,3	Inchangée	

## 2. Facteurs de risque

Certains auteurs ont suggéré que la réalisation d'hémocultures anaérobies soit réservée à patients présentant un profil clinique compatible, du fait de la présence d'un ou plusieurs facteurs de risque, avec une bactériémie anaérobie ou mixte.

Ceci est basé sur le fait qu'il a été rapporté que les bactériémies à anaérobies survenaient fréquemment sur des terrains particuliers. Dans ces études, il a en effet été observé que 77 à 86 % des patients présentaient des comorbidités (21,22). Les facteurs de risque particulièrement prédisposant aux bactériémies anaérobies sont :

- cancers : tumeurs solides avec ou sans métastases et les pathologies onco-hématologiques
- transplantation d'organes

- chirurgie récente d'origine gastro-intestinale ou gynéco-obstétrique
- obstruction intestinale ou maladie chronique inflammatoire de l'intestin
- abcès non drainés
- diabète
- bronchopneumopathie chronique obstructive
- hépatopathie chronique

L'hospitalisation pendant ou précédant l'épisode semble être également un facteur de risque. Ngo et al. (22) ont montré que 26% des bactériémies étaient d'origine communautaire et 33% nosocomiale. Le dernier groupe (41%) représentait des patients ayant leur première hémoculture positive avant 48 heures mais qui avait été récemment en contact avec le système des soins (hospitalisation dans les 90 derniers jours, patient résident d'un établissement de soins de longue durée ou hémodialysé en ambulatoire).

Classiquement une bactériémie anaérobie est liée à une source gastro-intestinale ou génito-urinaire (Tableau 4). Cependant, plusieurs études ont montré que dans environ 50% de cas, les bactériémies anaérobies survenaient dans un contexte clinique non évocateur. En effet, Lassman et al. (20) n'ont observé une porte d'entrée évocatrice d'infection à anaérobies que dans 38% des cas. Dans la série étudiée par Vena et al (14), seulement 55% des patients présentaient une source de bactériémie évoquant une étiologie anaérobie. Ceci contraste avec les données plus anciennes qui rapportaient que plus de 80% de patients présentant une source évidente d'infection à anaérobies (25).

**Tableau 4. Principales sources des bactériémies à bactéries anaérobies (11,21,22,24,26)**

Sources d'infection	Proportion (en %)
Gastro-intestinale	40-50
Tractus génital féminin	10-20
Oropharynx	10-20
Tissus mous	10
Tractus respiratoire bas	6-8
Corps étranger	faible
Inconnue	10-20

La réalisation systématique d'hémocultures anaérobies reste donc indiquée, d'autant plus que la proportion de patients présentant des facteurs de risque d'infection à anaérobies pourrait augmenter dans les années à venir. Il est à souligner qu'il a également été montré que la réalisation systématique d'hémocultures anaérobies permettait d'optimiser la détection d'autres espèces bactériennes, non anaérobies strictes. (19,27)

### 3. Mortalité

La mortalité liée aux bactériémies à anaérobies est importante. Elle est évaluée à environ **20%** (13, 38), mais pouvant varier de 10 à 55% (Tableau 3). Parmi les principaux facteurs de risque de mortalité des bactériémies anaérobies liés au terrain, on compte (22):

- une acquisition nosocomiale
- présence d'une tumeur solide (notamment cancer du pancréas, néoplasie du tractus digestif, cancer du poumon)
- présence d'une hémopathie (notamment lymphome et leucémie aiguë)
- présence d'une maladie cardio-vasculaire (cérébrale, coronaire ou périphérique)
- présence d'une hépatopathie sévère

L'espèce bactérienne peut, elle aussi, fortement influencer la mortalité. Les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, espèces le plus fréquemment isolées, contribuent à une morbidité et une mortalité importantes (18,21,28,29). Les bactériémies à *Clostridium* spp. sont également considérées comme ayant un mauvais pronostic (22). Il est à souligner qu'en moyenne la mortalité observée en cas de bactériémie polymicrobienne (en moyenne : 20%) n'est pas plus élevée que celle observée en cas de bactériémie mono-microbienne(21,30).

D'autres facteurs de mortalité sont liés à la prise en charge du patient. L'absence d'évacuation de foyer infectieux par chirurgie et l'inadéquation de traitement antibiotique sont des facteurs augmentant la mortalité. Noriega et al.(30) ont montré que la mortalité augmentait de 10,3 à 41% en l'absence d'un traitement adéquat. Salonen et al.(23) ont montré que la mortalité des patients augmentait en cas d'antibiothérapie inefficace sur les anaérobies. La mortalité passait de 18% à 55% pour les patients n'ayant reçu aucune antibiothérapie anti

anaérobies. Nguyen et al.(31) ont, quant à eux, démontré dans une étude prospective portant sur 128 bactériémies à *Bacteroides* du groupe *fragilis* que la mortalité était plus élevée chez les patients n'ayant pas reçu une antibiothérapie adaptée

La documentation bactériologique reste donc indispensable – sous réserve qu'elle soit disponible le plus précocement possible - à la bonne prise en charge d'une bactériémie anaérobie.

## 4. Diagnostic microbiologique

### a) Méthodes

Les hémocultures correspondent à une mise en culture réalisée « au lit du patient ». Le prélèvement sanguin est de ce fait réalisé de manière aseptique. Le sang recueilli est ainsi immédiatement inoculé dans des flacons contenant des milieux de cultures et une atmosphère gazeuse appropriés (flacons aérobies, flacons anaérobies ...). La ponction veineuse est la seule méthode valable pour prélever le sang en vue d'une hémoculture; les autres sites de prélèvement, notamment à travers un dispositif intravasculaire (cathéter,...), augmentent de façon significative la fréquence d'isolement des contaminants (32).

Le prélèvement est réalisé préférentiellement avant toute antibiothérapie. Il est important de considérer la quantité de sang à ensemercer. A volume de sang total égal, la probabilité de détection d'une bactériémie est équivalente avec un seul ou trois prélèvements. Le prélèvement unique (4 à 6 flacons) possède la même sensibilité que les prélèvements multiples (2 à 3 fois 2 flacons) mais présente en plus l'avantage de réduire les contaminations (taux divisé par 2 à 3) (32). La désinfection cutanée, précédant la ponction d'une veine périphérique, doit être particulièrement rigoureuse et utiliser successivement l'alcool à 70° et un produit iodé dont le temps de contact doit être respecté. L'ordre dans lequel les flacons doivent être ensemençés est important. Il est nécessaire de prélever le flacon anaérobie en 2<sup>ème</sup> position pour éviter l'introduction d'oxygène provenant de la tubulure.

La composition des milieux utilisés a évolué, en partie grâce à l'arrivée des systèmes automatisés. Les flacons sont composés d'un bouillon qui va permettre une dilution du sang au 1/10<sup>ème</sup> afin de réduire l'activité antibactérienne des éléments présents dans le sang (complément, lysozyme, cellules phagocytaires...). Le bouillon d'hémoculture contient notamment:

- des facteurs de croissance : la L-cystéine ou le pyridoxal afin de faciliter la détection des bactéries de culture lente ou difficile
- du dioxyde de carbone
- du polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) : un anticoagulant généralement utilisé à une concentration de 0,025 à 0,05 %. Le SPS favorise la croissance de la plupart des bactéries car il inhibe l'activité bactéricide du sérum et la phagocytose, il inactive le complément et neutralise le lysozyme et les antibiotiques de la famille des aminosides
- des résines adsorbantes de cations ou le charbon activé qui ont un effet neutralisant sur les antibiotiques.

### **b) Espèces bactériennes**

Dans la majorité des centres les principales espèces anaérobies retrouvées dans les bactériémies sont les bacilles à Gram négatif et particulièrement les ***Bacteroides du groupe fragilis*** (40-60% des cas). *Bacteroides fragilis* reste l'espèce la plus fréquemment rencontrée suivi de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Les autres espèces retrouvées sont :

- *Clostridium* spp. (15-35%)
- les Cocci à Gram positif anaérobies dont *Peptostreptococcus* spp. (8-20%)
- *Fusobacterium* spp. (6-8%)
- les bacilles anaérobies à Gram positif non sporulés (2-4%)

Les bactériémies polymicrobiennes représentent 20 à 30% des bactériémies. Les bactéries anaérobies sont alors associées dans 90% des cas avec au moins une bactérie aérobie. Les bactéries aérobies sont dans 43% des entérobactéries (majoritairement *Escherichia coli*) et dans 35% des cocci à Gram positif (streptocoques, entérocoques et staphylocoques) (22).

De même que les autres infections à anaérobies, les bactériémies dues à ces microorganismes sont liées, la plupart du temps, à une infection d'origine endogène d'une bactérie d'une flore commensale de l'homme. La nature des espèces bactériennes anaérobies isolées est variable selon la porte d'entrée potentielle ou le foyer infectieux initial (Tableau 5)

**Tableau 5. Principales espèces anaérobies impliquées dans les bactériémies selon la source (11,21,22,24,26)**

Source	Principales espèces impliquées
Gastro-intestinale	<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> <i>Clostridium</i> spp.
Tractus génital féminin	<i>Fusobacterium</i> spp. CGPA
Oropharynx	<i>Fusobacterium</i> spp. CGPA <i>Prevotella</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp.
Tissus mous	<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.
Tractus respiratoire bas	<i>Fusobacterium</i> spp. CGPA
Corps étranger	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Clostridium</i> spp.

L'isolement de certaines espèces permet d'orienter le diagnostic clinique, révélant une source d'infection restant jusque-là asymptomatique. Ainsi par exemple, *Clostridium septicum* est souvent associé avec un processus tumoral, *Clostridium sordelii* à un accouchement ou un avortement, *Clostridium novyi* à une toxicomanie IV. (33).

Malgré leur isolement dans les hémocultures, certaines bactéries n'ont pas de signification clinique. *Propionibacterium acnes* est très régulièrement considéré comme un contaminant de la peau. Ainsi, dans une des séries, il a été retrouvé significatif seulement dans 3,5% des cas (34). Il est alors souvent lié à la présence d'un corps étranger notamment les cathéters veineux centraux.

Concernant l'ensemble des bactéries, seulement 60 à 80% d'entre elles ont une signification clinique (Tableau 6). Cependant l'isolement de *Bacteroides* spp. est significatif dans plus de 90% des cas.



**Tableau 6. Signification clinique des bactériémies à anaérobies (21,23,35)**

Bactérie	Signification clinique (%)
<i>Bacteroides fragilis</i>	90-95
<i>Bacteroides</i> spp.	89-95
<i>Prevotella</i> spp.	100
<i>Clostridium</i> spp.	33-77
CGPA	60-77
<i>Propionibacterium</i> spp.	3,5 -15

Le diagnostic microbiologique des bactériémies à anaérobies est souvent difficile. Le délai d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques est souvent long, rendant son bénéfice individuel pour le patient médiocre.

### III. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies

Les bactéries anaérobies sont considérées comme des agents pathogènes importants dans de nombreuses infections. Cependant, l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques reste débattue (36). L'antibiogramme des isolats anaérobies est rarement réalisé en routine. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer. La sensibilité des anaérobies à l'oxygène rend leur isolement difficile. Leur culture nécessite un équipement spécifique :

- des milieux enrichis en facteurs de croissance tels que la vitamine K et l'hémine, indispensables à certaines espèces anaérobies
- des systèmes d'incubation dépourvus d'oxygène (jarres ou chambres anaérobies)

De plus, ces bactéries sont, pour certaines, de croissance lente [de 48 heures à 7 jours] (5) et sont souvent responsables d'infections polymicrobiennes, rendant leur isolement en culture pure difficile. Le délai d'obtention des résultats reste donc peu compatible avec une adaptation de l'antibiothérapie après 48 h de traitement,

La corrélation entre les résultats de sensibilité *in vitro* et la réponse clinique et bactériologique est difficile (4,13,37). Cliniquement, la présence de bactéries anaérobies résistantes à l'antibiothérapie peut passer inaperçue puisque beaucoup de ces infections nécessite principalement un débridement ou au drainage chirurgical. Néanmoins lors d'infections mono-microbiennes dues à des espèces à croissance rapide (ex : *Bacteroides* du groupe *fragilis*), des conditions adéquates de culture permettent d'obtenir des résultats dans un délai compatible avec l'adaptation d'antibiothérapie.

Malgré ces difficultés, il est à présent clairement établi qu'une élimination des bactéries anaérobies dans les infections mixtes a un impact sur leur résolution (33,38). De plus, il été démontré qu'une antibio-résistance des bactéries anaérobies pouvait entraîner un échec microbiologique et clinique. (20,23,31,33). La détermination de la sensibilité des anaérobies aux antibiotiques est donc importante, d'autant plus que leur résistance a augmenté au cours de ces 30 dernières années (51). Leur sensibilité est donc devenue moins prévisible , notamment pour *Bacteroides* du groupe *fragilis* (39).

## A. Quand évaluer la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies ?

Compte tenu des difficultés techniques, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des anaérobies est limitée à certaines situations (53) :

- infections sévères ou mettant en jeu le pronostic vital (abcès du cerveau, bactériémies, endocardites...)
- infections nécessitant un traitement prolongé (infections ostéo-articulaires, infections sur prothèses...)
- infections en échec clinique de l'antibiothérapie probabiliste
- infections impliquant des espèces connues pour leur résistance ou leur virulence : *Bacteroides* du groupe *fragilis*, *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Bilophila wadsworthia*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Sutterella* spp.
- infections mono-microbiennes à anaérobies

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies permet également une surveillance épidémiologique loco-régionale. En effet, de nombreuses études ont montré des profils de sensibilité variables en fonction des régions géographiques et des établissements (40). De ce fait, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), l'organisme américain de la standardisation en bactériologie clinique, recommande une surveillance annuelle de la sensibilité aux antibiotiques des anaérobies. Il est ainsi recommandé de déterminer la sensibilité à plusieurs familles d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, lincosamides, imidazolés) de 50 à 100 souches représentatives de l'échantillon local, dont au moins 20 *Bacteroides* spp., afin de suivre l'évolution des résistances au niveau local.

## B. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies

### 1. Définitions

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies est réalisée par des méthodes phénotypiques voire génotypiques.

L'étude phénotypique permet de caractériser *in vitro* l'activité antibactérienne des antibiotiques en déterminant :

- **la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)** : concentration minimale d'antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible après 18 à 24 (48 h pour les bactéries anaérobies) heures d'incubation à 35°C.
- **la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)** : concentration minimale d'antibiotique qui élimine 99,9% des bactéries d'un inoculum standardisé à  $10^5$ -  $10^6$  bactéries/mL.

Trois catégories cliniques sont retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* :

- **souches sensibles (S)** : pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cadre d'un traitement par voie systémique, avec la posologie recommandée dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP).
- **souches intermédiaires (I)** : pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique, qui peut être obtenu dans certaines conditions (e. g. posologies d'antibiotique accrues).
- **souches résistantes (R)** : pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique pour l'antibiotique considéré quelle que soit la dose utilisée.

## 2. Standardisation

Wexler et al. (36) démontraient en 1991 qu'une des raisons majeures de variabilité dans les résultats des CMI était la grande disparité des méthodes utilisées (milieux de culture, temps d'incubation de 18 à 48h, etc.). Ceci démontrait la nécessité d'une standardisation des procédures.

Il existe à présent plusieurs comités nationaux et internationaux de standardisation des techniques de réalisation des antibiogrammes :

- en France, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)
- en Europe, l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

- aux Etats-Unis, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Le CLSI a standardisé de nombreuses procédures dont les tests de sensibilités aux antibiotiques des bactéries anaérobies dans un document nommée M11. Pour ce groupe bactérien, il décrit deux méthodes de référence (dilution en milieu gélosé et dilution en milieu liquide en microplaques). Il constate cependant que la méthode de gradient d'antibiotique (Etest<sup>®</sup>) est équivalente aux méthodes de référence (25,40).

A l'heure actuelle, l'EUCAST ne spécifie pas de méthode particulière pour les anaérobies (41). Depuis 2014, le CA-SFM, membre actif de l'EUCAST, participe à l'harmonisation européenne des recommandations. Pour certains genres ou espèces bactériens, l'EUCAST ne propose pas encore de diamètres et/ou de concentrations critiques. Dans ces cas, les recommandations actuelles du CA-SFM / EUCAST conservent la méthodologie et les valeurs du communiqué CA-SFM 2013 (42). Il s'agit notamment des bactéries anaérobies.

Les CMI critiques retenues par les comités diffèrent. Ainsi, selon les bornes utilisées, la catégorisation clinique des anaérobies peut varier. Le tableau suivant montre à titre d'exemple la variabilité des concentrations critiques (retenues par chacun des trois comités sus-cités) pour trois molécules d'intérêt en cas d'infection à bactéries anaérobies.

**Tableau 7. Concentrations critiques EUCAST,CLSI et CA-SFM de pour la pénicilline G, la pipéracilline-tazobactam et le métronidazole (25,41,42)**

Antibiotique	EUCAST		CLSI		CA-SFM	
	Sensible	Résistant	Sensible	Résistant	Sensible	Résistant
Pénicilline G	≤0,25	>0,5	≤0,5	≥2	≤0,25	>0,5
Pipéracilline/tazobactam	≤8/4	>16/4	≤32/4	≥128/4	≤8/4	>16/4
Métronidazole	≤4	>4	≤8	≥32	≤4	>4

La comparaison des diverses études portant sur la sensibilité des anaérobies doit donc prendre en considération les bornes utilisées. Wybo et al. ont montré, par exemple, que la sensibilité à la pipéracilline/tazobactam dans leur étude était de 97,5% avec les recommandations CLSI et de 90,8% avec celles de l'EUCAST (43).

Les recommandations CA-SFM 2013 précisent que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies peut être réalisée par deux méthodes : la technique de dilution et la technique de diffusion. Ces recommandations précisent les milieux à utiliser, l'inoculum bactérien ainsi que le délai d'incubation. La liste standard des antibiotiques préconisés par le CA-SFM comprend les antibiotiques suivants :

- amoxicilline
- amoxicilline/acide clavulanique
- imipénème ou ertapénème
- céfoxitine
- clindamycine
- métronidazole
- vancomycine (pour les bactéries à Gram positif)

Cette liste n'est pas exhaustive et peut être complétée en fonction des espèces isolées, du type d'infection (ofloxacine pour les *Propionibacterium* spp. et quelques souches de *Peptostreptococcus* isolées d'infections osseuses ou cérébrales ou la spiramycine en cas d'infection dentaire) et de l'épidémiologie locale.

### 3. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques

#### a) Méthode de dilution en milieu gélosé

Pour toutes les espèces bactériennes, la méthode de dilution en milieu gélosé a été pendant longtemps considérée comme la **méthode de référence** pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (25,44).

La technique de dilution consiste à étudier la croissance d'une souche bactérienne en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. La méthode en milieu gélosé nécessite l'incorporation d'antibiotiques dans un milieu gélosé (gélose Brucella enrichie en hémine et en vitamine K1 et additionné de 5% de sang laqué de mouton) selon une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2, s'échelonnant de 0,06 à 128 mg/L. L'inoculum bactérien, standardisé au point 0,5 de l'échelle de McFarland, est préparé à partir d'une subculture sur gélose Columbia + 5 % de sang, ou gélose Brucella + vitamine K1 (1 mg/L) +

5 % de sang, suspendue dans un bouillon Brucella. Il est ensuite déposé sous forme de spot à l'aide d'un ensemencement à tiges multiples (Figure 2) qui dépose 1 à 2  $\mu\text{L}$  soit environ  $10^5$  UFC/spot.

L'incubation est de 48h en anaérobiose à 35-37°C.

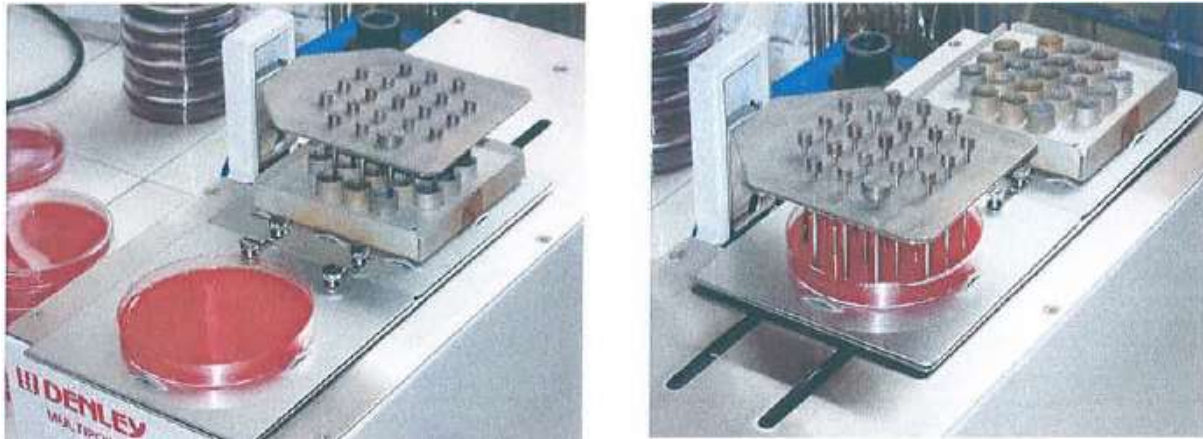


Figure 2. Inoculateur de Steers pour l'ensemencement de plusieurs souches bactériennes (45).

La CMI est ici définie comme la concentration d'antibiotique la plus faible entraînant l'inhibition de toute croissance visible ou entraînant un changement marqué de croissance (Figure 3)

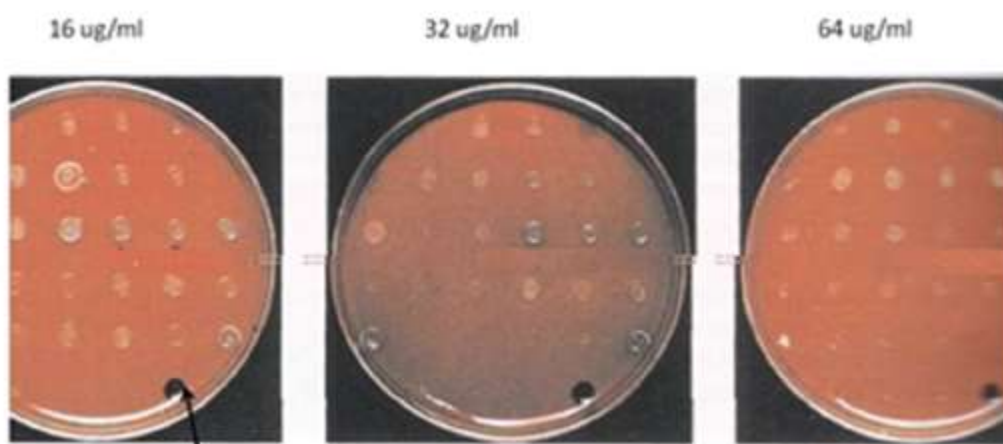


Figure 3. Série de géloses contenant trois concentrations différentes d'antibiotique(40)

Chaque gélose peut contenir 30 spots soit 30 souches à tester. Il est recommandé d'inclure des souches de contrôle de qualité tel que *B. fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, et *Clostridium difficile* ATCC 700057.

Cette méthode permet de tester un nombre important de souches. Elle n'est donc pas de pratique courante et est réservée aux laboratoires de référence. Elle est notamment très utile pour les études épidémiologiques de sensibilité aux antibiotiques sur de nombreuses souches car elle présente une excellente reproductibilité intra- et inter-laboratoires (46).

### ***b) Méthode de dilution en milieu liquide***

Le principe de la méthode est similaire à la précédente. Une gamme de concentrations d'antibiotiques de raison géométrique 2 est préparée à partir d'une solution d'antibiotique dans du bouillon Brucella enrichi en hémine (5 mg/L) et en vitamine K1 (1 mg/L). Ces dilutions sont ensuite distribuées soit dans des tubes (macrodilution) soit dans des puits d'une microplaque (microdilution).

L'inoculum bactérien est préparé à partir d'un bouillon Brucella et est ajusté au point 0,5 de l'échelle de McFarland, soit environ  $10^5$  UFC par tube ou cupule. Il est ensuite ajouté manuellement ou automatiquement (uniquement pour la technique de microdilution) (Figure 4).



**Figure 4. Pipette Sensitre® pour distribution dans une microplaque (40)**

L'étude en microplaques permet pour chaque souche une étude simultanée de 8 antibiotiques à 11 concentrations différentes dans 96 puits. Un témoin de culture est ajouté.



Le panel d'antibiotiques peut être préparé à l'avance et congelé à -70°C pour une utilisation dans les 4 à 6 mois.

Il existe également des microplaques prêtes à l'emploi contenant des antibiotiques sous forme congelée ou lyophilisée (Microscan®, MSI/MicroMedia®).

L'incubation est de 48h à 35-37°C en anaérobiose. La CMI est ici déterminé comme la concentration d'antibiotique la plus faible inhibant toute croissance bactérienne visible. La lecture est parfois difficile par un « effet de traînée » où il n'y a pas de limite tranchée entre culture et absence de culture visible. C'est notamment le cas avec certaines combinaisons bactérie/antibiotique incluant les *Fusobacterium* (46,47) .

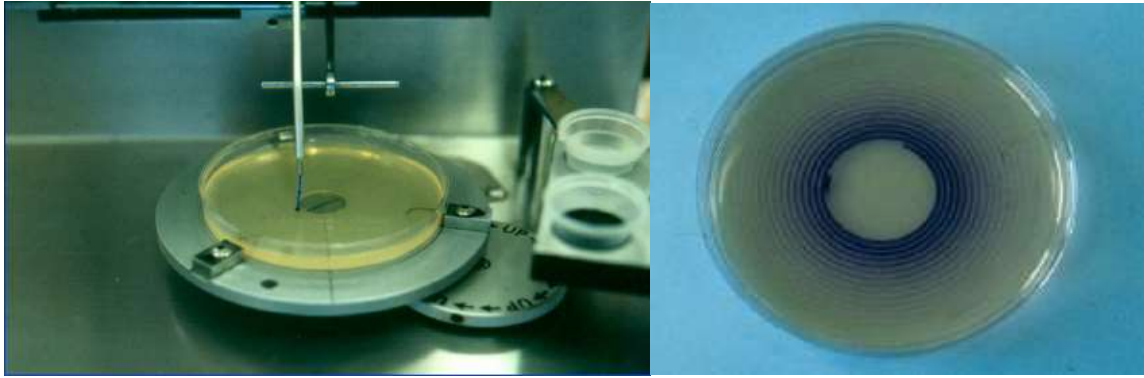
Les valeurs des CMI obtenues avec cette méthode sont bien corrélés mais souvent inférieures d'une dilution avec la méthode de dilution en milieu gélosé (36).

La technique par microdilution a été validée par la CLSI comme **méthode de référence** uniquement pour *Bacteroides* du groupe *fragilis*, en raison de leur relative aérotoleérance. Cependant, les laboratoires possédant des chambres anaérobies peuvent utiliser cette méthode pour d'autres souches (48) . Ainsi, 40% des laboratoires aux Etats Unis utilisent cette méthode en routine.

Il est à noter que la méthode de macrodilution permet d'explorer le pouvoir bactéricide des antibiotiques par détermination des CMB (47). Cependant la détermination des CMB est fastidieuse et coûteuse. Elle n'est donc pas utilisable en pratique courante.

### **c) Méthode utilisant un ensementeur en spirale**

Cette méthode utilise le système spiral (SGE : Spiral Gradient Endpoint) qui permet de déposer une quantité déterminée d'antibiotiques à la surface de la gélose par le biais d'un stilet venant s'appuyer sur une boîte de Pétri en rotation. Ce mode de dépôt permet la formation d'un gradient de concentration décroissant de l'antibiotique du centre vers la périphérie.



**Figure 5 Système Spiral® (46)**

Après diffusion de l'antibiotique dans la gélose pendant 3 à 4 heures, on inocule les boîtes (inoculum bactérien ajusté au point 0,5 de l'échelle de McFarland) en réalisant pour chaque souche une strie du centre vers la périphérie de la boîte. Ceci peut être réalisé de manière manuelle à l'aide d'un écouvillon ou automatiquement à l'aide d'un ensemenceur de type Steers qui permet l'obtention de stries en étoile. Sur une seule boîte contenant un gradient de 8 dilutions, on peut ensemencer simultanément 17 souches. L'incubation est de 48h à 35°C en anaérobiose. On mesure pour chaque strie la distance entre le centre de la boîte et le point d'arrêt de la croissance bactérienne. Un programme informatique permet de transformer cette distance en CMI.

Les CMI mesurées avec cette technique ont été corrélées avec la méthode de référence dans 90% des cas ( $\pm$  une dilution) dans plusieurs études (49–52). Cette technique présente l'avantage d'être proche de la dilution en gélose (bonne croissance des bactéries exigeantes) tout en ayant un temps de préparation réduit car elle dispense de la préparation des boîtes contenant les dilutions d'antibiotiques. De plus, la lecture est facile et les valeurs des CMI sont précises. Cependant l'équipement nécessaire est très coûteux et il nécessite un temps supplémentaire pour la diffusion des antibiotiques avant inoculation. Cette technique est donc peu utilisée en routine et dans les études épidémiologiques.

#### ***d) L'epsilomètre***

Il s'agit d'une méthode simple qui permet de déterminer la CMI par une bandelette en plastique imprégnée sur une face d'un gradient de concentration d'antibiotique prédéterminé et d'une échelle de lecture interprétative sur l'autre face. Cette bandelette est déposée sur une

gélose Brucella préalablement ensemencée par écouvillonnage (inoculum bactérien ajusté au point 1 de l'échelle McFarland). Le Etest<sup>®</sup> (bioMérieux) et MICE<sup>®</sup> (Oxoid) ont été validées pour les bactéries anaérobies.

L'incubation est de 48 à 72 heures en anaérobiose. La lecture de la CMI est déterminée au niveau de l'intersection entre la zone elliptique d'inhibition et la bandelette (Figure 6). Lorsque l'intersection se situe entre deux graduations, il est recommandé de prendre en compte la valeur la plus élevée (46).



**Figure 6. Etest (bioMérieux (40))**

Selon différents auteurs, les CMI mesurées par Etest<sup>®</sup> sont généralement inférieures à celles de la méthode de référence (53,54). Cependant les résultats des diverses études étaient variables en fonction des antibiotiques employés, des milieux utilisés et surtout de la durée d'incubation (46).

La durée d'incubation influence beaucoup les résultats. Dans l'étude de Rosenblatt et Gustafson (55), à 24 heures d'incubation 36% des résultats étaient non lisibles et 22% des résultats apparaissent faussement sensibles tandis qu'à 48 heures, les chiffres étaient de 5% non lisibles et 3,2% de faux sensibles. Une lecture à 48 heures est notamment impérative pour la clindamycine.

D'une manière générale, la corrélation des CMI déterminées en Etest<sup>®</sup> avec la méthode de référence est bonne : de 84 à 91% des résultats sont comparables à plus ou moins

une dilution et 87 à 98% des résultats sont comparables à plus ou moins deux dilutions tandis que des faux résistants ou faux sensibles sont inférieurs à 4% (46,53–58).

Cette technique est de réalisation simple et rapide. Elle permet en plus de tester les antibiotiques récents. C'est ainsi que la CLSI a jugé cette technique équivalente à la méthode de référence.

Cette méthode est donc utilisable en pratique quotidienne. Aux Etats-Unis, 62% des laboratoires utilisent cette technique pour étudier la sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques (48). Il faut noter cependant que le coût élevé de cette méthode limite le nombre d'antibiotiques étudiés.

#### *e) Galerie ATB ANA® (bioMérieux)*

Il s'agit d'une méthode de dilution. La galerie ATB ANA® permet d'étudier la sensibilité des bactéries anaérobies à 13 antibiotiques. Chaque antibiotique, disposé dans des cupules, est présent à deux concentrations choisies d'après les concentrations critiques recommandées par le CLSI et le CA-SFM.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture sur gélose ou en bouillon pour obtenir une suspension ajustée au point 3 de l'échelle de McFarland soit  $9 \times 10^8$  UFC/mL. Une partie de cette suspension est introduite dans une ampoule contenant un milieu ATB-S. Ce milieu est ensuite transféré dans chaque cupule puis la galerie est incubée 48h en anaérobiose à 35°C.

La lecture de la croissance est faite soit visuellement, soit à l'aide d'un lecteur automatique ATB®. Les résultats sont exprimés en souches sensibles, intermédiaires ou résistantes selon les concentrations critiques.



**Figure 7. Galerie ATB ANA®**

En termes de catégorisation clinique, les résultats sont concordants avec la méthode de référence dans 88 à 94% des cas tandis qu'il y a entre 2,2 et 5,7% de faux résistants et entre 0,6 et 1,5% de faux sensibles (59–61).

Cette méthode simple, rapide et de faible coût n'est cependant pas adaptée à certaines bactéries exigeantes. En effet, Dubreuil et al.(60) ont remarqué que 20% des souches (notamment celles du genre *Eubacterium* et *Peptostreptococcus*) ne se développent pas dans le milieu ATB-S. De plus, il est souvent difficile d'atteindre l'inoculum de 3 McFarland exigé par le fabricant. Enfin le choix des antibiotiques à tester n'est pas possible.

### **f) Méthode de diffusion en milieu gélosé**

Cette méthode consiste à déposer des disques ou des comprimés chargés d'une quantité déterminée d'antibiotique sur un milieu gélosé préalablement ensemencé par écouvillonnage à partir d'une culture pure. L'antibiotique diffuse à partir du disque créant un gradient de concentration. Après incubation, on observe une zone circulaire d'inhibition de croissance bactérienne centrée sur le disque. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la CMI et une catégorisation clinique (S, I, R) de la souche, basée sur la corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de diffusion et la méthode de référence.

Pour la technique de diffusion, le CA-SFM recommande l'utilisation d'un inoculum de 1 de l'échelle McFarland. Il est ensemencé sur une gélose Brucella ou Wilkins Chalgren. Après 48h d'incubation à 37°C, le diamètre de la zone d'inhibition est comparé aux diamètres critiques définis par le CA-SFM. Il s'agit d'une méthode simple, rapide et d'un coût modéré.

Cependant cette méthode montre de nombreuses limites concernant les bactéries anaérobies. Étudiée depuis les années 1980, elle a été montrée peu reproductible et les coefficients de corrélations liant les résultats des diamètres à ceux obtenus par la méthode de référence ont parfois été bas, allant de 0,4 à 0,94 selon les espèces, en particulier celles à croissance lente (46). Ces difficultés sont principalement liées aux temps de croissance très fluctuants des anaérobies. Les diamètres d'inhibition ne sont pas analysables en présence de cultures modestes, de film ou de voile à la surface de la gélose, de doubles zones d'inhibition. Cette méthode n'est d'ailleurs pas recommandée par le CLSI.

Plusieurs publications récentes ont étudié la méthode de diffusion pour les *Bacteroides* du groupe *fragilis* en utilisant les bornes établies par l'EUCAST. Une bonne corrélation a été retrouvée entre les diamètres d'inhibition et les CMI obtenues par la méthode de dilution en milieu gélosé pour plusieurs antibiotiques (imipénème, métronidazole, moxifloxacine...) (62,63). Pour d'autres antibiotiques, on obtient une bonne séparation entre les souches résistantes et sensibles (clindamycine, méropénème). Cette méthode a également été évaluée pour *Clostridium difficile* et une très bonne corrélation entre les diamètres d'inhibition et les CMI a été démontrée (64).

En conclusion, malgré les problèmes de corrélation avec les CMI pour les espèces de croissance lente, la technique de diffusion présente l'avantage d'être simple, peu coûteuse et facilement utilisable dans un laboratoire de routine. Elle permet de distinguer les souches sauvages des souches ayant acquis une résistance à certains antibiotiques. Une diminution importante du diamètre affirme dans quasiment tous les cas une résistance de haut niveau. La détection des résistances à l'imipénème, à la clindamycine et au métronidazole chez *B.fragilis*, à l'amoxicilline chez *Fusobacterium* et *Clostridium* est aisée. Cependant la détection des résistances de faible niveau peut s'avérer délicate. La détection d'une résistance hétérogène au métronidazole nécessite par exemple une incubation prolongée à 4 – 5 jours. Une diminution de diamètres d'inhibition nécessite une vérification des CMI par Etest<sup>®</sup> ou une méthode équivalente.

### **g) Recherche de la production de $\beta$ -lactamase**

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes inactivant les  $\beta$ -lactamines à des degrés divers. Le test à la nitrocéfine (Céfinase<sup>®</sup>) est un test simple et rapide qui permet de les détecter chez les bactéries anaérobies.

Un disque de papier imprégné d'une céphalosporine chromogène, la nitrocéfine, est déposé sur une lame de verre. On étale sur le disque plusieurs colonies de la souche à tester. La  $\beta$ -lactamase hydrolyse le lien amide dans la chaîne  $\beta$ -lactame de la nitrocéfine provoquant le changement de couleur du jaune au rouge. L'apparition du changement de couleur apparaît après 5 à 10 min de contact mais il peut prendre 60 minutes à 37°C. L'incubation au-delà n'est pas nécessaire car une dégradation non spécifique du substrat peut apparaître (faux positif).

Les  $\beta$ -lactamases ont été retrouvées chez de nombreuses bactéries anaérobies listées dans le tableau 8. La production d'une  $\beta$ -lactamase a été décrite chez 95 à 100% des

*Bacteroides* du groupe *fragilis*, ce qui rend inutile sa détection. Par contre, cet examen doit être réalisé chez les bactéries appartenant aux genres *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* et chez certaines espèces de *Clostridium*.

Une souche productrice de  $\beta$ -lactamase doit être considérée comme résistante à la pénicilline G et aux aminopénicillines. D'autres  $\beta$ -lactamines peuvent être touchées en fonction de l'affinité de l'enzyme. L'activité des  $\beta$ -lactamines est restaurée lors de l'association avec un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase, sauf pour *C. clostridioforme* et *C. ramosum* (47).

Le test à la nitrocéfine est un examen complémentaire rapide mais ne dispense pas de réaliser un antibiogramme pour étudier la sensibilité des autres antibiotiques. De plus la résistance aux  $\beta$ -lactamines n'est pas obligatoirement enzymatique, d'autres mécanismes pouvant être impliqués (modification de la cible ou de la perméabilité membranaire).

**Tableau 8. Espèces anaérobies chez lesquelles une production de  $\beta$ -lactamase a été mise en évidence (46).**

Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif
<b><i>Clostridium</i> spp.</b> <i>C.butyricum</i> <i>C.clostridioforme</i> <i>C.ramosum</i>	<b><i>Prevotella</i> spp.</b> <i>P.bivia</i> <i>P.buccae</i> <i>P.oris</i> <i>P.melaninogenica</i> <i>P.disiens</i> <i>P.oralis</i> <i>P.ruminicola</i>
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	<b><i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i></b>
	<b><i>Fusobacterium</i> spp.</b> <i>F.nucleatum</i> <i>F.mortiferum</i> <i>F.varium</i>
	<b>Autres bacilles à Gram négatif</b> <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> <i>Porphyromonas uenonis</i> <i>Bilophila wadsworthia</i> <i>Alistipes finegoldii</i>

#### **h) Détection des résistances par méthodes moléculaires**

La détection des gènes de résistance par les techniques moléculaires est réservée aux laboratoires spécialisés. Deux groupes de gènes sont particulièrement recherchés : *nim* et *cfiA*. Ils sont responsables respectivement de résistances au métronidazole et aux carbapénèmes.

La détection des gènes *nim* a été décrite en 1996 en utilisant des amorces spécifiques, NIM-3 et NIM-5, suivi d'un clivage par une enzyme de restriction pour déterminer le type de gène *nim* (65,66). Il a été décrit 10 gènes *nim* (*nimA* à *nimJ*) découverts notamment chez *Bacteroides* du groupe *fragilis* et chez *Prevotella*. Ces gènes ont, pour la plupart, une localisation plasmidique. Le gène *nimB* est localisé sur le chromosome (66–69), de même que les gènes I et J (69,70). Il est à noter que la transcription de ces gènes est régulée par différents promoteurs localisés sur des séquences d'insertion. La présence d'un gène ne confère donc pas forcément de résistance phénotypique. Il est également possible qu'une mutation du gène ou l'insertion d'une séquence d'insertion immédiatement en amont du gène *nim* conduise à une surexpression du gène, ce qui conduit à une augmentation de la CMI du métronidazole (68). La détermination de la CMI reste donc indispensable, d'autant plus que des souches résistantes ont été décrites sans qu'un gène *nim* soit mis en évidence (68,71).

De même, le gène chromosomique *cfiA* retrouvé chez *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron* code une métallo- $\beta$ -lactamase induisant une résistance aux carbapénèmes ainsi qu'aux autres  $\beta$ -lactamines. Sa présence seule n'engendre pas de résistance. C'est l'acquisition d'une séquence d'insertion en amont du gène qui permet son expression. Une dizaine de séquences d'insertion ont déjà été décrites (72). La présence du gène *cfiA* ainsi que des séquences d'insertion associées peut être déterminée par PCR (73). Comme pour le métronidazole, la résistance aux carbapénèmes peut être liée à une autre cause que la présence du gène *cfiA*. Des pompes à efflux et l'imperméabilité jouent également un rôle dans cette résistance (74). La recherche du gène *cfiA* doit donc être recherchée uniquement chez des souches suspectes phénotypiquement de résistance aux carbapénèmes. Une détermination des CMI reste indispensable.

De nombreux autres gènes de résistances aux autres familles d'antibiotiques ont été décrits. Il s'agit des gènes *erm*, *tet*, induisant des résistances, respectivement, aux macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) et aux tétracyclines. Le gène *mefA* code des pompes à efflux (75). Ces gènes peuvent être recherchés lors des études épidémiologiques.

Des PCR multiplex ciblant les différents gènes impliqués dans les résistances aux antibiotiques des *B. fragilis* ont été testées pour aider la prédiction des résistances (figure 8) (76).



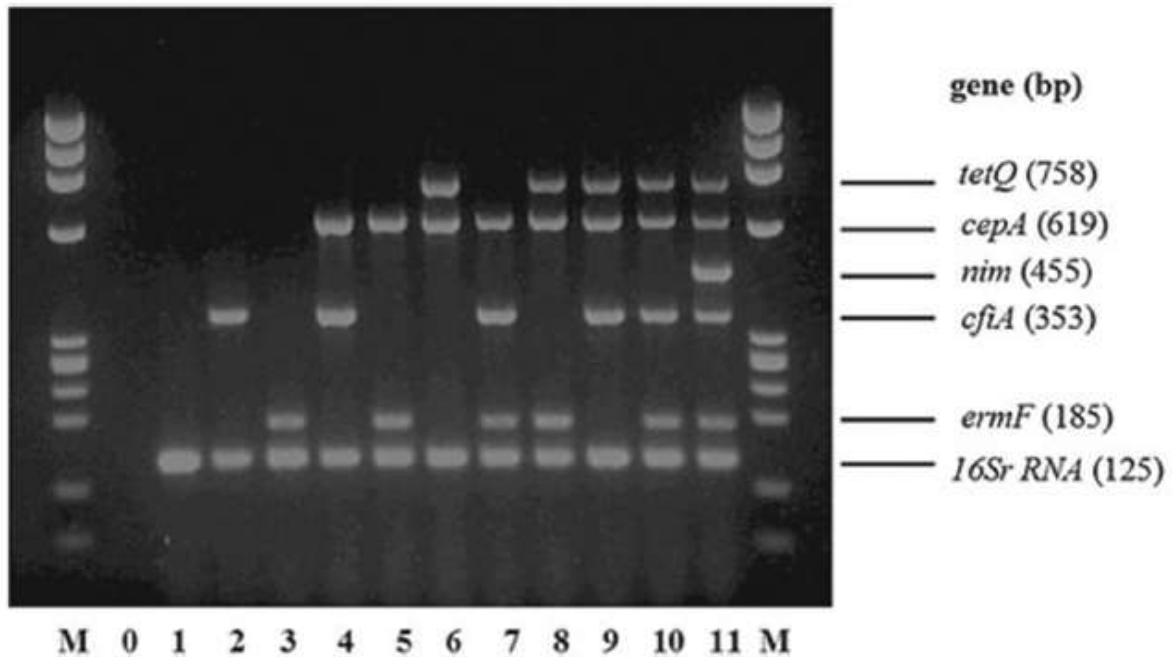


Figure 8. PCR multiplex détectant les principaux gènes de résistance de *B. fragilis*

#### i) Nouvelles méthodes de détection de résistances

Des travaux récents ont porté sur l'utilisation de la spectrométrie de masse de type *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight* (SM MALDI TOF) pour la recherche de résistances aux carbapénèmes de souches de *B. fragilis*. Les premières études avaient pour but d'évaluer la capacité de la spectrométrie de masse à détecter les souches de *B. fragilis* porteuses du gène *cfiA*. Les souches porteuses du gène présentaient des CMI de l'imipénème de 0,06 à plus de 32 mg/L. L'étude des spectres a permis de distinguer 10 pics de masse/charge permettant de distinguer ces souches au sein de la population de *B. fragilis* (77–79).

D'autres auteurs ont étudié la détection de la résistance aux carbapénèmes en analysant l'hydrolyse de l'értapénème par SM MALDI-TOF. Les produits d'hydrolyse de l'értapénème étaient détectés après un contact avec les souches productrices de carbapénémase (Figure 9) (80,81). Cette technique présente l'avantage de détecter l'expression du gène *cfiA* et non seulement sa présence.

Ces techniques doivent cependant être validées sur un plus grand nombre de souches et restent pour l'instant du domaine de la recherche.

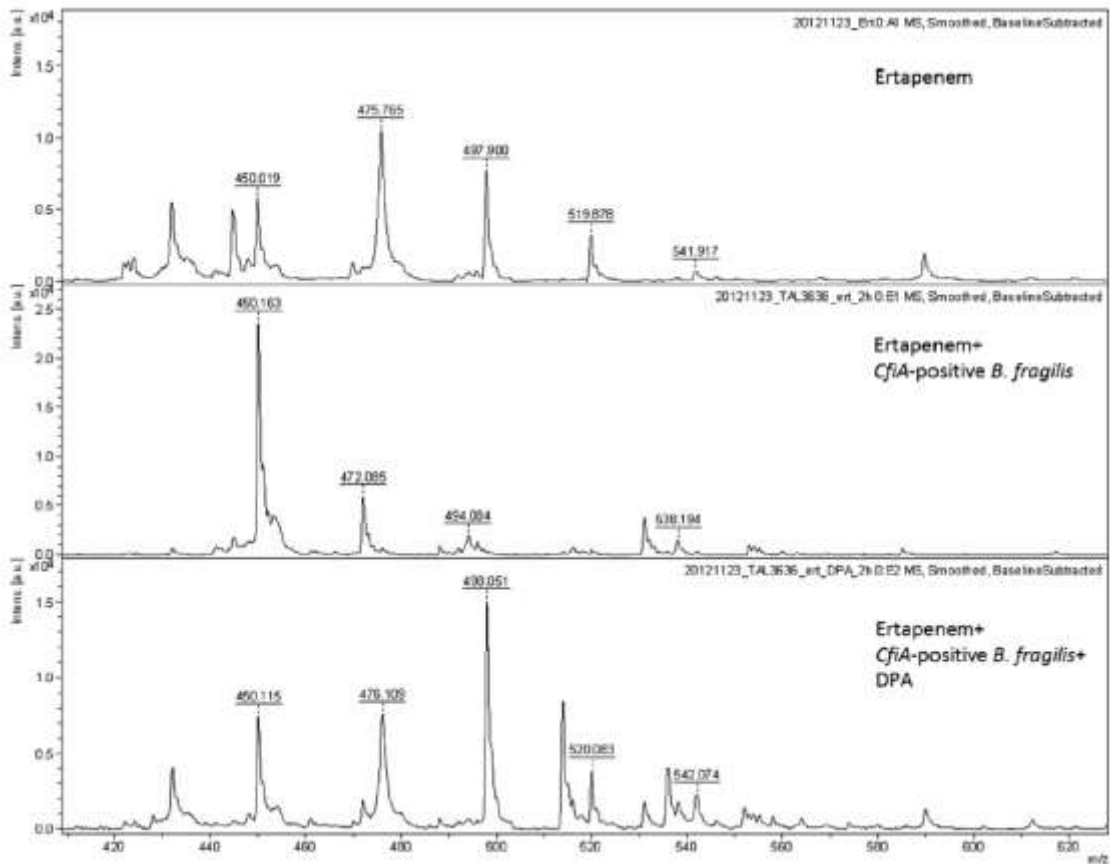


Figure 9. Etude de l'hydrolyse de l'ertapénème par la SM MALDI TOF.

## C. Etat des lieux de la résistance antibiotique des bactéries anaérobies

### 1. Résistances naturelles

Certaines résistances aux antibiotiques sont présentes chez les bactéries de manière innée. On parle de résistance naturelle ou intrinsèque. Les gènes de résistance sont présents sur le chromosome bactérien. Ces résistances sont alors fixes et constantes à l'intérieur du taxon. A ce titre, elles constituent un critère d'identification de l'espèce.

Toutes les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport dépendant de la chaîne oxydative, qui est absente chez les anaérobies. Elles sont également résistantes à l'aztréonam (sauf *Fusobacterium*), au triméthoprimé et aux quinolones. D'autres résistances naturelles sont spécifiques de certaines espèces (Tableau 9).

**Tableau 9. Résistances naturelles des bactéries anaérobies (82)**

<b>Bactérie</b>	<b>Antibiotique</b>
Toutes les bactéries anaérobies	Aminosides Aztréonam (sauf <i>Fusobacterium</i> ) Quinolones Triméthoprim
<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>	Aminopénicillines Céphalosporines 1ère génération Céfamandole Céfuroxime Colistine Polymyxine B Glycopeptides Fosfomycine
<i>Prevotella</i>	Glycopeptides, fosfomycine
<i>Porphyromonas</i>	Fosfomycine Colistine Polymyxine B
<i>Fusobacterium</i>	Macrolides (bas niveau)
<i>Fusobacterium varium</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i>	Rifampicine
<i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Peptostreptococcus</i>	Colistine Polymyxine B Fosfomycine
<i>Clostridium difficile</i>	Céphalosporines
<i>Clostridium innocuum</i>	Vancomycine (bas niveau)
<i>Actinomyces</i> <i>Propionibacterium</i>	Céphalosporines 1ère génération Nitro-imidazolés Ornidazole
<i>Mobiluncus</i>	Nitro-imidazolés
<i>Veillonella</i>	Macrolides (bas niveau) Glycopeptides

## 2. Résistances acquises

A côté de la résistance naturelle, des résistances acquises concernent seulement quelques souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle peut s'étendre de façon importante. Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie par mutation, transduction ou, plus fréquemment, par l'acquisition d'un plasmide porteur de gènes de résistance. L'expression de ces gènes permet de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce.

L'acquisition de résistance est liée à l'utilisation croissante d'antibiotiques et a été largement décrite chez les bactéries aérobies. L'acquisition de la résistance des anaérobies a été moins étudiée, mais il a été montré qu'elle augmentait également au sein de ce groupe bactérien. Des souches multi-résistantes ont notamment été décrites au sein des *Bacteroides* du groupe *fragilis* (83–85).

### a) *Bacteroides* du groupe *fragilis*

*Bacteroides* du groupe *fragilis* rassemble la majorité des espèces du genre *Bacteroides*. Ce groupe comprend 26 espèces dont les principales sont : *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* et *B. vulgatus*. Ce groupe est impliqué dans de nombreuses infections et comporte les espèces les plus résistantes parmi les bactéries anaérobies. C'est pourquoi, il fait l'objet d'une surveillance nationale et internationale. Différentes études ont montré que *B. fragilis* était le plus sensible aux antibiotiques parmi les membres du groupe *fragilis* (86).

#### (1) $\beta$ -lactamines

La résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines chez les *Bacteroides* du groupe *fragilis* se caractérise par trois mécanismes majeurs (40):

- la sécrétion d'enzymes inactivatrices ( $\beta$ -lactamase)
- la modification de cible [Protéines Liant la Pénicilline (PLP)] induisant une perte d'affinité
- la diminution de la perméabilité membranaire par altérations des porines ou la présence de systèmes d'efflux.

La sécrétion de  $\beta$ -lactamase est le mécanisme de résistance le plus fréquent. La quasi-totalité (>97%) des souches sécrète une  **$\beta$ -lactamase chromosomique** codée par le gène *cepA* (87). Il s'agit d'une enzyme de classe A dans la classification d'Ambler. Elle hydrolyse les

céphalosporines de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération mais pas les céphamycines (céfoxitine et céfotétan). Les pénicillines sont également touchées sauf les pénicillines semi-synthétiques que sont les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les uréido-pénicillines (pipéracilline). Cette  $\beta$ -lactamase est fortement inhibée par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase (l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam) rendant les associations avec les pénicillines sensibles. L'activité des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération est faible et variable (CMI de 16 à 128 mg/L) (88). Bien que certaines souches puissent paraître sensibles en méthode de diffusion, il faut considérer les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération inactives et les souches apparemment sensibles sont à interpréter comme intermédiaires. Les principaux phénotypes de résistances retrouvées sont indiqués dans le Tableau 10.

La sécrétion d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique codée par le gène *cepA* explique la résistance à la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline. La présence du gène n'est cependant retrouvée que dans 50 et 78,9% des souches chez *B. fragilis* et dans 36,4% des souches appartenant à d'autres *Bacteroides* (75,89). Sa présence n'est également pas corrélée avec la CMI de l'ampicilline (de 2 à 256 mg/L voir Figure 10), ce qui confirme l'implication d'autres mécanismes de résistance pour l'ampicilline.

Tableau 10. Phénotypes et fréquence de résistance aux  $\beta$ -lactamines des *Bacteroides* du groupe *fragilis* (88).

$\beta$ -lactamines	Souche sauvage $\beta$ -lactamase chromosomique	Hyperproduction de la $\beta$ - lactamase + défaut de porine ou carbapénèmase silencieuse				Carbapénèmases
	78%	9%	5%	3%	3%	2%
Amoxicilline	I/R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + ac. clavulanique	S	S	S/I	I/R	R	R
Ticarcilline	S	R	R	R	R	R
Ticarcilline + ac. clavulanique	S	S	S	S	I	R
Pipéracilline	S	I/R	R	R	R	R
Pipéracilline + tazobactam	S	S	S	S	I	R
Céfotaxime	I/R	R	R	R	R	R
Céfoxitine	S/I	I	I/R	R	R	R
Céfotétan	S/I	I	R	R	R	R
Imipénème	S	S	S	S	S	R

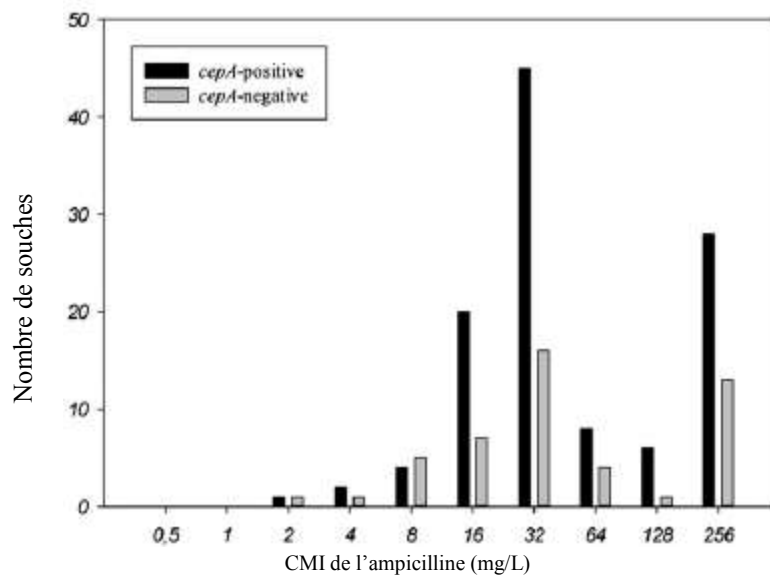


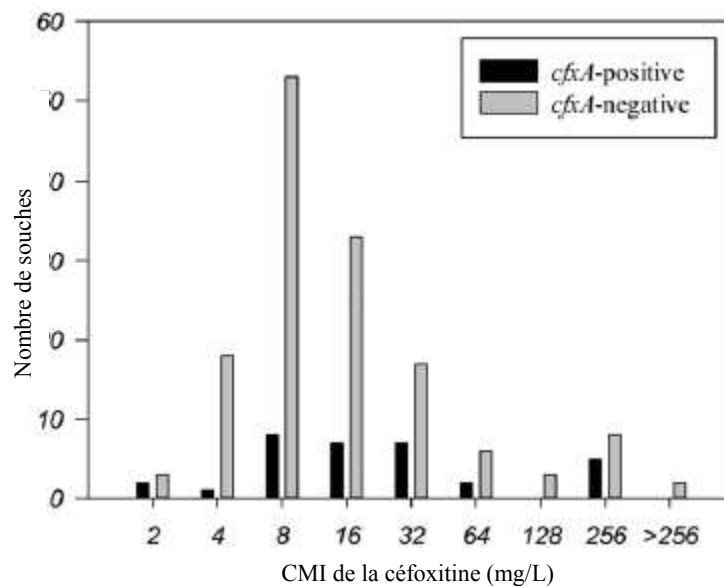
Figure 10. Distribution des CMI de l'ampicilline chez des souches de *Bacteroides* selon la présence ou l'absence du gène *cepA*

Cette distribution montre également que l'expression du gène *cepA* est variable. La présence de la séquence d'insertion *IS1124* en amont du gène *cepA* (87) entraîne une **surproduction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique** (CMI de l'amoxicilline > 128 mg/L). Elle peut être associée ou non à un défaut de porine qui augmente encore les CMI (90). La résistance est alors croisée avec la ticarcilline et la pipéracilline. Ces *Bacteroides* du groupe *fragilis* représentent environ 30% (22%-39%) des souches dans les études européennes et américaines (40,88,91-93).

L'utilisation **d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase** permet la récupération de l'activité des pénicillines pour la plupart de ces souches d'où leur intérêt en thérapeutique. Cependant, des souches résistantes à ces associations ont commencé à apparaître. Ce type de résistance est liée à l'hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique associée à la modification des protéines de membrane externe qui peut limiter l'entrée des inhibiteurs (88). Cette résistance s'exprime à des degrés divers. C'est d'abord l'association amoxicilline + acide clavulanique qui est touchée puis l'association ticarcilline + acide clavulanique et enfin l'association pipéracilline + tazobactam. La résistance à l'amoxicilline/acide clavulanique est d'environ 3 à 8% dans les études françaises et est considérée stable dans le temps (47,67,88,92). D'autres études européennes retrouvent une augmentation de la résistance au cours des 20 dernières années (de 1 à 10,4%) (85). Elle varie en fonction des pays mais aussi des espèces, *P. distans* ayant 20% de résistance alors que *B. fragilis* présente 4 à 6% de résistance à l'amoxicilline/acide clavulanique. L'association pipéracilline + tazobactam reste l'association la plus active, avec seulement 2-3% de souches résistantes. Il est à noter que les taux évoqués par les différentes études sont à interpréter avec prudence car l'interprétation des CMI varie énormément en fonction des référentiels choisis. Jamal et al. (94) ont démontré que 0% des souches de *B. fragilis* isolées au Koweït étaient considérées comme résistantes à l'association pipéracilline + tazobactam selon les recommandations américaines de la CLSI, alors que selon les recommandations européennes de l'EUCAST, ce taux atteignait 21,2%.

**Les céphamycines**, céfoxitine et céfotétan, sont les seules céphalosporines ayant une bonne activité sur les *Bacteroides* du groupe *fragilis*. La céfoxitine reste la molécule la plus active. Cependant une progression régulière de la résistance a été observée. En Europe, elle est estimée actuellement autour de 10-20% (43,47,85,88,92,93) et entre 5 et 10% aux Etats-Unis (40,48,86). Certaines espèces ont particulièrement des taux élevés (environ 25%) : *P. distans*, *B. thetaiotaomicron*, et *B. ovatus*. Les mécanismes de résistance de ces molécules sont multiples. L'hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique est évoquée ainsi que

des mécanismes non enzymatiques (réduction de la perméabilité membranaire ou/et moindre affinité des PLP). Certaines souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* sécrètent une autre enzyme dégradant la céfoxitine. Cette enzyme est codée par le gène *cfxA* qui est transférable par un transposon mobile (MTn4555) (95,96). Ce gène est souvent associée à une résistance à haut niveau à l'amoxicilline (CMI > 256 mg/L). Cependant, ce gène n'est retrouvé que chez 27% des souches résistantes à la céfoxitine (85) et son niveau d'expression est très variable (Figure 11). Ceci confirme l'intervention d'autres mécanismes de résistance concernant la céfoxitine.



**Figure 11. Distribution des CMI de la céfoxitine chez des souches de *Bacteroides* selon la présence ou l'absence du gène *cfxA* (85)**

Les **carbapénèmes** sont les  $\beta$ -lactamines les plus actives. Elles restent actives même en présence de tous les mécanismes précédemment évoqués. Les premières souches résistantes à l'imipénème ont été décrites en 1986 (97). Il s'agissait de souches de *B. fragilis* résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines. Cette résistance est liée chez *B. fragilis* à la production d'une carbapénémase zinc-dépendante, une métallo-enzyme de la classe B dans la classification d'Ambler (88). Cette  $\beta$ -lactamase n'est pas sensible à l'acide clavulanique, au tazobactam ou au sulbactam. Elle hydrolyse toutes les pénicillines et céphalosporines y compris les céphamycines. Elle est codée par le gène *cfiA* (ou *ccrA* pour céfoxitine-carbapénème résistance) d'origine chromosomique. De rares souches présentant une localisation plasmidique de ces gènes ont été rapportées au Japon (98). Le gène *cfiA* est silencieux sauf en cas de présence d'une séquence d'insertion agissant en tant que promoteur



fort en amont du gène. Plusieurs séquences d'insertion ont été décrites : IS1186, IS1187, IS1188, IS942, IS612 à IS615. Cependant, on a également décrit des souches *cfiA* positives dépourvues de séquence d'insertion mais sécrétant une carbapénémase (99). Ces travaux suggèrent qu'il existe un autre mécanisme d'activation du gène. L'expression du gène étant très variable, les CMI de l'imipénème vis-à-vis des souches *cfiA*<sup>+</sup> vont de 1 à 256 mg/L. Les souches *cfiA*<sup>+</sup> représentent environ 5 à 10% de toutes les souches de *B. fragilis* (75,89). Il est fort probable que ces souches représentent une espèce différente : l'hybridation ADN-ADN est faible avec les souches *cfiA*<sup>-</sup> et le gène *cepA* de la céphalosporinase chromosomique n'est jamais retrouvé chez les souches *cfiA*<sup>+</sup> (100).

Chez les autres *Bacteroides* du groupe *fragilis*, la résistance aux carbapénèmes s'explique par l'addition de plusieurs mécanismes (88,91) :

- modification des PLP 1 et 2
- mutations de porines
- hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique

Cette résistance reste cependant relativement rare (0,5 à 9%). Elle est aussi très variable en fonction des pays et des hôpitaux. La prévalence est faible aux Etats-Unis comparés aux études européennes et asiatiques (Tableau 11). Des études locales sont nécessaires pour vérifier l'absence d'émergence de ce type de souches.

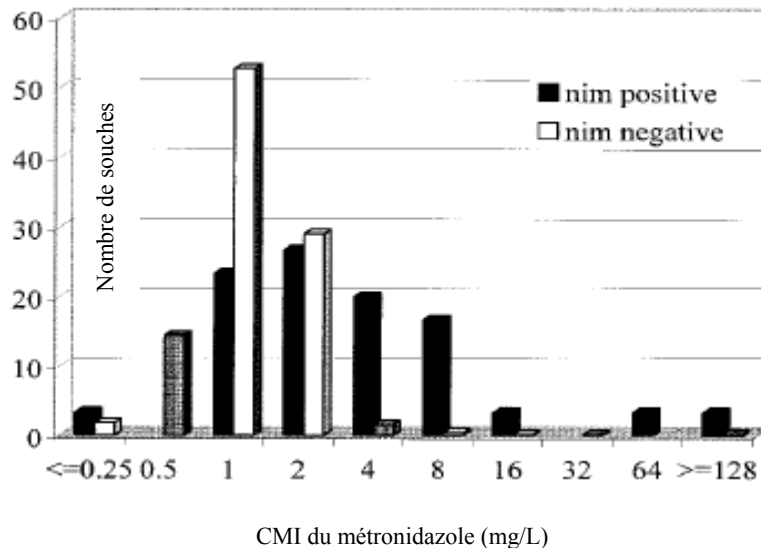
**Tableau 11. Niveau de résistance aux carbapénèmes de souches de *B.fragilis* dans le monde**

<b>Etude</b>	<b>Période d'étude</b>	<b>Pays</b>	<b>Molécule</b>	<b>Souches résistantes (%)</b>
Singer et al. (92)	2008	France	Imipénème	1,4
Behra-Miellet et al. (93)	2003	France	Imipénème	1,6
Trevino et al. (73)	2012	Espagne	Imipénème	1,8
Seifert et al. (101)	2010	Allemagne	Imipénème	7,5
Wybo et al. (43)	2013	Belgique	Méropénème	9
Nagy et al. (85)	2008-2009	Europe	Imipénème	1
Eitel et al. (89)	2008-2009	Europe	Imipénème	0,8
Lee et al. (102)	2008-2009	Corée du sud	Imipénème Méropénème	2 5
Liu et al. (103)	2008	Taïwan	Imipénème Méropénème	3 5
Fernandez-Canigia et al. (104)	2010	Argentine	Imipénème Méropénème	1,5 2,5
Jamal et al. (94)	2013	Koweït	Imipénème Méropénème	1,1 2,5
Karlowsky et al. (105)	2010-2011	Canada	Imipénème	0,9
Snydman et al. (86)	2006-2009	Etats-Unis	Imipénème Méropénème	0-2,7 0,6-5,4

## (2) Métronidazole

Le métronidazole est l'antibiotique le plus couramment utilisé dans les infections à anaérobies. Il appartient à la famille des 5-nitro-imidazolés. Malgré sa large utilisation en prophylaxie et en traitement curatif, peu de résistances ont été décrites. Ces résistances sont sous la dépendance des gènes *nim* dont le support est chromosomique ou plasmidique (68–70,88). Ces gènes codent une nitro-réductase qui transforme le groupement nitré (NO<sub>2</sub>) du métronidazole en substituant aminé (NH<sub>2</sub>) non toxique pour l'ADN. L'expression des gènes *nim* nécessite la présence d'un promoteur. La plupart du temps, ce promoteur est faible conduisant à une sensibilité diminuée au métronidazole (CMI du métronidazole de 4 à 16 mg/L contre 0,25 à 2 mg/L chez les souches sensibles). L'expression

du gène est augmentée en présence d'un promoteur fort (séquence d'insertion IS1168 pour *nimA* et *nimB*, IS1169 pour *nimD* et IS1170 pour *nimC*). L'expression très variable du gène *nim* conduit à des CMI du métronidazole allant de 1,5 à plus de 128 mg/L (figure 12). La présence du gène a été retrouvée chez 2 à 24% des souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* (66,68,89). Le gène *nimA* est retrouvé dans la majorité de cas (50% des souches).



**Figure 12. Distribution des CMI du métronidazole chez des souches *Bacteroides* du groupe *fragilis* selon la présence ou l'absence du gène *nim* (66)**

Des résistances au métronidazole non associées aux gènes *nim* ont également été décrites. Il s'agissait de patients ayant eu un traitement prolongé par métronidazole. Le mécanisme de ces résistances n'est pas connu mais l'induction de résistance a été observé en présence de métronidazole *in vitro* (66,106).

Peu de souches ont des résistances à haut niveau (CMI >16 mg/L). Une telle résistance a été constaté chez seulement 6 souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* aux Etats-Unis et a été associée à un échec clinique (40). En France, une seule souche avec une CMI élevée (64mg/L) a été isolée. Cette souche possédait deux copies du gène *nimA* dans son chromosome (93).

### (3) Macrolides et tétracyclines

Plus de la moitié des souches de *Bacteroides* est résistante aux macrolides et aux tétracyclines (88). La **clindamycine** a été pendant longtemps une molécule très active contre les anaérobies. Seulement 3% à 10% des souches étaient résistantes au début des années 1990. Cependant, depuis les années '90, cette résistance est en augmentation. Actuellement elle est évaluée entre 18%-37% selon les différentes études mondiales (43,85,86,93,101,103). *B.*

*fragilis* est moins résistant (15% de souches résistantes environ) que les autres *Bacteroides* (80% pour *B.thetaiotaomicron*). C'est pourquoi, la clindamycine n'est plus recommandée dans le traitement empirique des infections intra-abdominales.

La résistance de haut niveau à la clindamycine est médiée par un mécanisme de type MLS<sub>b</sub> (macrolide-lincosamide-streptomycine B) () *via* une méthylase. Elle est croisée entre les macrolides et la clindamycine. Elle est codée et régulée par différents gènes *erm*, les mêmes que ceux retrouvés chez des bactéries aérobies comme les staphylocoques (*ermB*, *ermC*, *ermF*, *ermG* *ermQ*) (40,88,107). D'autres mécanismes touchent une minorité de souches.

La résistance aux **tétracyclines** chez les *Bacteroides* du groupe *fragilis* est liée à un mécanisme de protection ribosomale. Il implique les gènes de résistance *tetQ* ou, moins fréquemment, des gènes *tetM* ou *tet36* (107). La tigécycline qui représente une nouvelle classe d'antibiotique (glycylcycline) a une excellente activité *in vitro* contre les *Bacteroides* du groupe *fragilis* même chez les souches résistantes à la tétracycline (43,108). Il est à souligner qu'aucune concentration critique n'a été établie par l'EUCAST et le CLCI pour les bactéries anaérobies.

#### (4) Fluoroquinolones

Les premières fluoroquinolones, comme l'ofloxacine et la ciprofloxacine, sont inactives contre la plupart des bactéries anaérobies. Seules quelques fluoroquinolones ont une bonne activité *in vitro* (sur au moins 90% des souches de bactéries anaérobies testées). Il s'agit notamment de la moxifloxacine qui présente une excellente activité. Ceci justifie son utilisation dans les infections intra-abdominales. Cependant une augmentation de résistance à la moxifloxacine a été observée chez les *Bacteroides* du groupe *fragilis* dans plusieurs études américaines et européennes (48,85,109,110). La résistance à la moxifloxacine a ainsi augmenté de 9 à 15% en 10 ans en Europe avec des différences notables selon les régions (29% de résistance en Europe du Nord contre 7,6% en Europe du Sud). Cette variabilité est liée probablement à la politique d'usage des fluoroquinolones (ciprofloxacine et ofloxacine) dans les différents pays. Pour les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, le taux de résistance est d'environ 30 à 40% (43,86).

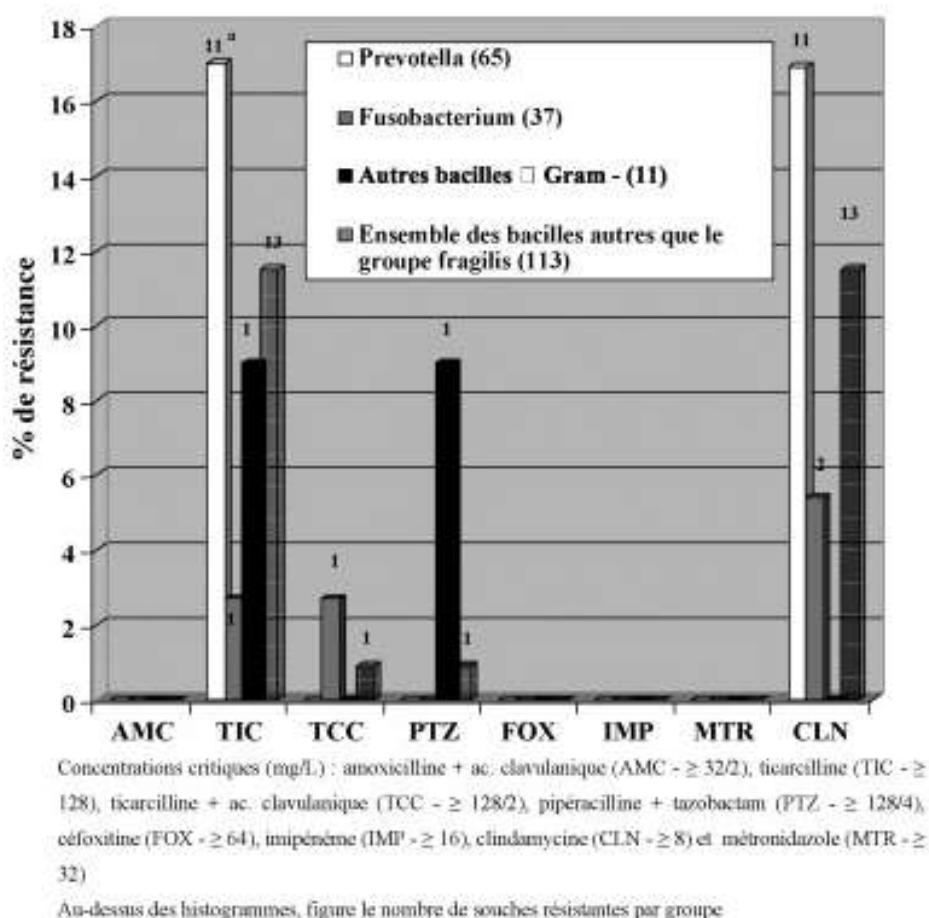
Le mécanisme de résistance aux fluoroquinolones est le même que pour les bactéries aérobies et implique deux mécanismes (88,91,111) :

- **une modification de la cible** - les ADN gyrases - qui induit une diminution de l'affinité des fluoroquinolones. Elle est liée à des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB*. décrites notamment dans la région QRDR (quinolone-resistance-determining-region) du gène *gyrA*.
- **une augmentation de l'expression des pompes à efflux.**

#### *b) Autres bacilles à Gram négatif*

Les espèces des genres *Porphyromonas*, *Prevotella* et *Fusobacterium* sont en général plus sensibles aux antibiotiques que les *Bacteroides* du groupe *fragilis*. Cependant, il faut considérer que les études de surveillance les concernant sont moins nombreuses.

La Figure 13 résume la fréquence de la résistance aux antibiotiques en France des principaux anaérobies stricts à Gram négatif hors *Bacteroides* du groupe *fragilis*.



**Figure 13. Fréquence de la résistance aux antibiotiques des principaux anaérobies à Gram négatif hors *Bacteroides* du groupe *fragilis* en France (92)**

Les souches sauvages de *Prevotella* spp. sont très sensibles aux  $\beta$ -lactamines. Elles présentent néanmoins souvent une résistance à la pénicilline et aux aminopénicillines liée à la production d'une  $\beta$ -lactamase codée par le gène *cfxA* ou de  $\beta$ -lactamases proches de celles des *Bacteroides* (91). Les  $\beta$ -lactamases sont détectées par le test à la nitrocéfine<sup>®</sup> pour toutes les souches dont la CMI à la pénicilline G est supérieure à 8 mg/L. Les souches productrices de  $\beta$ -lactamase ont largement augmentées entre 1994 (27%) et 2000 (65%) (47). Actuellement, ce chiffre est stable avec environ deux tiers des souches produisant cette  $\beta$ -lactamase (88,91,112). Il est cependant variable en fonction des espèces (50% des *P. oris* contre 75% des *P. bivia*). Cette  $\beta$ -lactamase inactive en plus des aminopénicillines, les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération, le céfuroxime et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération orales. Elle est

inhibée par l'action des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase (88). Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération injectables et les carbapénèmes conservent d'excellentes activités. Quelques souches présentent des résistances à la ticarcilline ou au céfotaxime probablement liées à des mécanismes non enzymatiques (112).

De très rares souches résistantes au métronidazole ont été décrites. Il s'agissait de *P. bivia* possédant le gène *nimA* et de *P. melaninogenica* ne possédant aucun gène *nim* connu à l'époque (113). Un échec clinique a également été découvert lors d'une bactériémie causée par *Prevotella* spp. présentant une résistance hétérogène au métronidazole (114). Le gène *nimI* a été découvert chez des espèces de *P. baroniae* sans qu'il n'y ait d'expression phénotypique (69).

Les résistances aux macrolides, à la clindamycine et aux streptogramines sont très rares. La résistance à la clindamycine (5% des souches) est liée à la présence des gènes *ermF* et *ermG* (91,107). La résistance à la tétracycline est de 50% et est liée à la présence des gènes *tet(M)*, *tet(Q)* et *tet(W)*. La tigécycline présente quant à elle une excellente activité (91). La moxifloxacin reste très active sur ces souches (>90% des souches sensibles).

Les ***Porphyromonas*** sont des espèces très sensibles aux antibiotiques. Jusqu'à présent aucune résistance n'a été décrite pour le métronidazole, les associations pénicillines + inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase, et les carbapénèmes. La résistance aux macrolides et à la clindamycine est exceptionnelle tout comme celles à la moxifloxacin et à la tigécycline (88). De rares souches (5 à 10%) sont résistantes à l'amoxicilline par production d'une  $\beta$ -lactamase codée par le gène *cfxA*.

Les ***Fusobacterium*** sont des bactéries anaérobies très sensibles aux antibiotiques. Quelques souches (<5%) ont acquis une pénicillinase. Cette  $\beta$ -lactamase est détectable par le test à la nitrocéfine<sup>®</sup> pour la plupart des souches. Il s'agit d'une  $\beta$ -lactamase de classe D codée par le gène *fus1* (115,116). Elle induit une résistance croisée à la pénicilline G, aux aminopénicillines, à la ticarcilline et à la pipéracilline. L'acide clavulanique et le tazobactam permettent une récupération de l'activité des pénicillines. Les autres  $\beta$ -lactamines présentent une excellente activité, tout comme le métronidazole et la tigécycline. Les taux de résistances à la clindamycine et à la moxifloxacin restent assez faibles (10-15%) (43,88,91).

### c) *Cocci anaérobies à Gram positif*

La classification taxonomique des Cocci anaérobies à Gram Positif (CAGP) a subi de nombreux changements durant les vingt dernières années. Le genre *Peptococcus* ne comprend plus que *P. niger* et de nombreux autres genres ont été créés comme : *Anaerococcus*, *Finegoldia* (*F. magna*), *Parvimonas* (*P. micra*) et *Peptoniphilus*. De plus, ces bactéries ont été pendant longtemps difficiles à différencier dans les laboratoires de routine. L'analyse de la sensibilité de ces bactéries est donc d'interprétation difficile.

#### (1) Bêta-lactamines

La résistance aux pénicillines est faible (10%) mais variable en fonction des espèces : *P. anaerobius* (26%) et *P. micra* (2%) (43,117,118). La résistance à l'amoxicilline semble due à une modification de PLP car il n'a jamais été mise en évidence la production de  $\beta$ -lactamase (91,119).

Les associations pénicillines + inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase, les céphalosporines et les carbapénèmes ont une excellente activité (>95%).

#### (2) Macrolides

De même que les pénicillines, la résistance à la clindamycine (4-17%) varie en fonction des espèces : *F. magna* (13,3%) et *P. anaerobius* (1,1%) (43,117,118). Cette résistance aux macrolides est liée à une résistance de type  $MLS_b$  constitutionnelle ou inductible conférée par de multiples gènes dont le principal est le gène *ermTR* (91,119).

#### (3) Métronidazole

L'ensemble des bactéries de ce groupe ont une excellente sensibilité vis-à-vis du métronidazole. Cependant des souches de *F. magna* et *P. micra* ont été rapportées résistantes au métronidazole (43,117). Le gène *nimB* a été retrouvé sur un tiers de souches de CAGP mais seulement 2 souches sur 21 présentaient une résistance de haut niveau au métronidazole (CMI > 128 mg/L) (120). L'expression du gène *nim* dépend de la présence de séquences d'insertion apportant des promoteurs forts ou faibles.



#### d) *Clostridium*

Les bactéries du genre *Clostridium* sont des bacilles à Gram positif sporulés. Ils présentent une large sensibilité naturelle notamment aux  $\beta$ -lactamines. Cependant les phénotypes de résistance peuvent varier selon l'espèce.

##### (1) *Clostridium difficile*

Cette espèce présente des sensibilités variées aux différentes  $\beta$ -lactamines (94,119) :

- une sensibilité très bonne (>85%) aux pénicillines avec ou sans inhibiteur de  $\beta$ -lactamases.
- une résistance naturelle aux céphalosporines
- une faible sensibilité à l'imipénème avec des CMI variant de 1 à plus de 16 mg/L. Le méropénème est plus actif (10% de souches résistantes).

La résistance à la clindamycine est élevée et concerne environ 30 à 70 % des souches (121). Elle est associée au gène *erm(B)* portée par le transposon non conjugatif Tn5398 (122). La résistance aux fluoroquinolones et notamment à la moxifloxacine a augmenté depuis quelques années (environ 25%). Elle est probablement liée à la diffusion de clones hyper virulents comme le ribotype 027 (91,121,123,124). Ces souches résistantes présentent des mutations dans les gènes *gyrA* ou *gyrB* à l'origine d'une modification des gyrases.

Le métronidazole reste une molécule largement active sur cette espèce. Cependant des travaux récents ont évoqué la présence de souches résistantes ou de sensibilité diminuée mais aucun échec clinique n'a été constaté (125) . La prévalence de cette résistance est très variable en fonction des pays : 6% en Espagne (126), 1,6% au Canada mais pas de résistance observée dans de nombreux autres pays, dont la France (94,119,121). Pour détecter la résistance au métronidazole une incubation prolongée est nécessaire (3 à 4 jours). Cette résistance est hétérogène. La présence des gènes *nim* n'a pas été détectée chez les souches de *C. difficile* résistantes (127).

Parmi les souches testées jusqu'à ce jour, 100% de souches présente une sensibilité à la vancomycine (CMI<4 mg/L) et à la fidaxomicine, nouvel antibiotique utilisé dans les infections récidivantes à *C. difficile* (121,128,129).

##### (2) *Autres Clostridium*

Les espèces de *Clostridium* (autres que *C. difficile*) sont globalement sensibles aux différentes classes d'antibiotiques. Les principales résistances observées concernent la

céfoxitine (10-20%), la clindamycine (20-30%) et la moxifloxacine (30%) (43,91,119). Cependant certaines espèces présentent des profils particuliers. Trois espèces de *Clostridium* peuvent produire une  $\beta$ -lactamase détectable par la méthode chromogénique (nitrocéfine<sup>®</sup>) (119):

- *C. butyricum* (30% des souches) : enzyme sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase.
- *C. clostridioforme* (30% des souches) : enzyme résistante aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase. La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est également possible.
- *C. ramosum* (5% des souches) : enzyme résistante aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase.

*C. perfringens* est très sensible aux  $\beta$ -lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes) ainsi qu'à la clindamycine (85% de souches sensibles). Quelques souches sont résistantes aux fluoroquinolones avec un mécanisme semblable à celui de *C. difficile*.

*C. innocuum* présente une résistance naturelle de bas niveau à la vancomycine due à la synthèse de précurseurs de peptidoglycane de type UDP-MurNac-pentapeptide [D-sérine] (119). Cette espèce est particulièrement résistante à la céfoxitine et certaines souches sont de sensibilité diminuée à l'imipénème.

### e) *Bacilles à Gram positif non sporulés*

Le groupe de bacilles à Gram positif non sporulés est très hétérogène et peu d'études de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisées, particulièrement après les remaniements taxonomiques récents de certains genres (*Eggerthella*, *Slackia*, *Colinsella*...).

La plupart des genres appartenant à ce groupe (*Eubacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*) sont sensibles aux  $\beta$ -lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes) (91). A l'inverse de nombreuses, résistances au métronidazole sont décrites.

#### (1) *Propionibacterium*

La résistance naturelle au métronidazole chez *Propionibacterium* peut s'expliquer par l'absence d'activité pyruvate empêchant la formation de composés réduits du métronidazole, toxiques pour l'ADN (119). Le gène *nimA* codant pour une nitroréductase a été détecté chez certaines souches de *Propionibacterium*, ce qui peut laisser supposer que ce genre constitue un réservoir possible de ce gène (130).

Une étude européenne (131) a montré que les bactéries du genre *Propionibacterium* sont très sensibles aux  $\beta$ -lactamines. La résistance aux macrolides est modérée (érythromycine 17%, clindamycine 15%) et est reliée à des mutations ponctuelles de l'ARNr 23S ou à la présence du gène *ermX*.

L'activité des fluoroquinolones sur *P. acnes* est très bonne ce qui est particulièrement intéressant dans les infections ostéo-articulaires, compte tenu de la bonne diffusion osseuse de ces molécules (132).

## (2) *Actinomyces*

Les bactéries du genre *Actinomyces* sont généralement sensibles aux  $\beta$ -lactamines, bien que des souches de sensibilité intermédiaire aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ont été décrites (133). De même la clindamycine et la moxifloxacine sont assez actives mais des souches présentant des CMI à la limite de la sensibilité ont été décrites (91).

La résistance au métronidazole est naturelle et est liée, comme pour *Propionibacterium*, à l'absence d'activité pyruvate (119).

La résistance antibiotique des bactéries anaérobies est en augmentation continue depuis ces dernières décennies en parallèle des observations faites sur les bactéries aérobies. La sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques est devenue moins prévisible. Ce problème nécessite une surveillance régulière de l'épidémiologie locale de ces bactéries d'autant plus que les profils de sensibilité sont variables selon les pays et les hôpitaux. Ce phénomène est lié très probablement aux habitudes locales différentes de prescription d'antibiotiques. Des tests de sensibilité utilisant des méthodes standardisées sont nécessaires afin d'ajuster les protocoles d'antibiothérapie probabiliste.

# Travail personnel

## I. Objectifs

Les anaérobies sont des constituants naturels de la flore bactérienne de l'homme. Ils sont à l'origine d'infections endogènes très variées, souvent sévères. Le traitement de ces infections est souvent probabiliste, compte tenu de la culture fastidieuse de bactéries anaérobies empêchant la réalisation d'un antibiogramme en routine. Cependant depuis une dizaine d'années, la résistance aux antibiotiques des bactéries anaérobies, notamment au sein des *Bacteroides* du groupe *fragilis* (39), a augmenté. De ce fait, une surveillance annuelle de la sensibilité aux antibiotiques des anaérobies est nécessaire afin de déterminer l'épidémiologie locale et de vérifier la pertinence de protocoles d'antibiothérapie empirique.

Dans ce contexte, ce travail avait pour objectif de comparer i) les caractéristiques générales (sociodémographiques, type et durée d'hospitalisation) des patients hospitalisés au CHRU de Nancy, ayant eu une bactériémie à anaérobies en 2010 et en 2014 et ii) et celles des isolats correspondants (profils de résistance, espèces).

## II. Matériels et méthodes

### A. Données bio-cliniques

L'étude a porté sur toutes les hémocultures positives à au moins une espèce anaérobie chez des patients du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Nancy durant deux périodes : du 1<sup>er</sup> janvier 2010 au 31 décembre 2010 et du 1<sup>er</sup> janvier 2014 au 31 décembre 2014. Les données microbiologiques ont été extraites rétrospectivement en utilisant les logiciels ENTREPOT<sup>®</sup> (Info Partner) et BACTERIO<sup>®</sup> (Info Partner). Les données suivantes étaient disponibles dans la base de données électronique :

- Données concernant le patient : âge au moment du prélèvement, sexe, date d'admission, service clinique d'hospitalisation. Les données cliniques (sources d'infection, diagnostic final, antibiothérapie...) n'étaient pas disponibles.
- Données concernant le prélèvement : date et heure de prélèvement, espèce(s) (ou le cas échéant genre) bactérienne(s) isolée(s) dans chaque flacon
- Profil de sensibilité aux antibiotiques

Les souches étudiées comprennent toutes les bactéries identifiées au minimum au genre et pour lesquels un antibiogramme a été réalisé. Pour ces souches les données de sensibilité aux antibiotiques comprenaient :

- les diamètres mesurés par la technique de diffusion
- pour certaines souches, selon les procédures du laboratoire :
  - la CMI Etest<sup>®</sup> pour certains antibiotiques déterminés
  - les résultats de la recherche de gènes de résistance (*cfiA*, *nim*)
  - les résultats de la recherche de  $\beta$ -lactamase

## B. Hémocultures et méthodes d'identification des isolats

Habituellement une, deux ou trois paires de flacons d'hémoculture (BD BACTEC<sup>™</sup> Plus Aerobic/F et BD BACTEC<sup>™</sup> Lytic/10 Anaerobic/F, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) prélevés dans les services cliniques étaient incubées dans l'automate BD Bactec<sup>™</sup> 9240, pendant au minimum 5 jours. Tous les flacons détectés positifs par l'automate étaient retirés de l'appareil puis une aliquote de sang était prélevée pour l'examen direct après coloration de Gram et subculture (milieux solides et liquides).

L'identification des bactéries a été faite selon les méthodes utilisées en routine au laboratoire en 2010 et en 2014:

- Par des tests d'identification présomptifs :
  - culture dans des conditions anaérobies versus aérobie
  - aspect après coloration de Gram
  - aspect des colonies
  - production de catalase
  - sensibilité à la vancomycine (5  $\mu$ g), à la colistine (10  $\mu$ g) et au métronidazole (16 UI) (Oxoid)
  - évaluation de la croissance en présence d'inhibiteurs tels que la bile (1 mg) et le vert brillant (100  $\mu$ g) pour les bacilles à Gram négatif (Thermoscientific) et pour les cocci à Gram positif, sensibilité au polyanéthol sulfonate de sodium (1 mg)
- Par étude des caractères métaboliques (fermentation, métabolisme protéique...) à l'aide de galeries commercialisées
  - API 20 A<sup>®</sup> (bioMérieux)
  - Rapid ID 32A<sup>®</sup> (bioMérieux)
  - Rapid ANA II<sup>®</sup> (Oxoid)
  - Vitek<sup>®</sup> 2 carte ANC (bioMérieux)
- Par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : Vitek MS<sup>®</sup> IVD (bioMérieux) pour les souches de 2014
- Par biologie moléculaire : séquençage du gène codant l'ARN ribosomique 16S

L'origine de la bactériémie a été définie comme communautaire lorsque les hémocultures positives ont été prélevées jusqu'à 48 heures après l'admission et comme nosocomiale lorsque le prélèvement a été réalisé au-delà de 48 heures post admission (32).

*Propionibacterium acnes* (bactérie commensale de la peau) a été considéré comme contaminant s'il était isolé dans un seul flacon sur plusieurs prélevés chez un patient de manière rapprochée (32).

### **C. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats**

Les données de sensibilité aux antibiotiques de souches anaérobies ont été extraites rétrospectivement de la base de données. La sensibilité a été évaluée en routine par la méthode de diffusion. Les autres méthodes décrites ci-après n'ont été réalisées que pour certaines souches, remplissant les critères préétablis.

#### ***a) Méthode de diffusion avec disques Conditions et milieux de culture***

En routine, l'inoculum bactérien était réalisé à partir d'une subculture en milieu solide Brucella (BBL®, Becton Dickinson) additionnée de 5% de sang de mouton (Oxoid), de 1 µg/mL de vitamine K1 (Sigma-Aldrich,) et de 5 µg/mL d'hémine (Sigma-Aldrich) incubée en anaérobiose pendant 24h.

L'inoculum était préparé dans une suspension en bouillon Brucella au standard numéro 1 de l'échelle de McFarland. L'ensemencement par écouvillonnage était réalisé sur des géloses Brucella + vitamine K1 + de l'hémine selon les recommandations du CA-SFM (même recommandations en 2010 et 2013) (42).

La lecture des diamètres d'inhibition était réalisée après une incubation de 48 heures à 35°C en atmosphère anaérobie (85% N<sub>2</sub> - 10% CO<sub>2</sub> - 5% H<sub>2</sub>) obtenue à l'aide d'une chambre anaérobie (Don Whitley Scientific) ou d'une jarre avec les sachets générateurs d'anaérobiose (Anaerogen, Oxoid).

### **b) Molécules testées**

Les analyses ont porté sur les antibiotiques suivants (43):

- Amoxicilline (charge du disque 25 µg, Oxoïd)
- Amoxicilline/ acide clavulanique (charge du disque 20/10µg, Oxoïd)
- Pipéracilline/ tazobactam (charge du disque 75/10 µg, Oxoïd)
- Céfoxitine (charge du disque 30 µg, Oxoïd)
- Imipénème (charge du disque 10 µg, Oxoïd)
- Clindamycine (charge du disque 2UI, Oxoïd)
- Moxifloxacine (charge du disque 5 µg, Oxoïd)
- Métronidazole (comprimé de 16 µg (NEO-SENSITABS<sup>®</sup>, Rosco)

Les diamètres ont été lus à la zone d'inhibition de croissance selon deux méthodes :

- Manuelle : lecture visuelle à l'aide d'un pied à coulisse ou d'un décimètre
- Semi-automatisée : lecture à l'aide de l'automate SirScan 2000<sup>®</sup> (i2A)

L'interprétation des diamètres a été basée sur le référentiel du CA SFM version 2013 (42). Pour la céfoxitine, les diamètres non reliés à une espèce ont été utilisés (Tableau 12).

**Tableau 12. Diamètres critiques de catégorisation clinique des antibiotiques étudiés**

Antibiotique	Diamètres critiques (mm)	
	Sensible	Résistant
Amoxicilline	≥ 21	< 17
Amoxicilline / acide clavulanique	≥ 21	< 17
Pipéracilline / tazobactam	≥ 21	< 19
Céfoxitine	≥ 22	< 15
Imipénème	≥ 24	< 17
Clindamycine	≥ 15	< 15
Moxifloxacine	≥ 21	< 18
Métronidazole	≥ 21	< 21



## 2. Recherche de $\beta$ -lactamase

La recherche de  $\beta$ -lactamase a été réalisée par le test à la céphalosporine chromogène - nitrocéfine (Céfinase<sup>®</sup>, Becton Dickinson). Cette recherche a été effectuée sur toutes les souches de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium clostridioforme* et *Clostridium ramosum*.

## 3. Détermination des CMI

La détermination de la CMI était parfois nécessaire en fonction des résultats obtenus par la méthode de diffusion :

- en cas de diminution du diamètre du métronidazole (diamètre < 35 mm), excepté pour les souches naturellement résistantes (*Actinomyces* spp. et *Propionibacterium* spp.) et pour les *Bifidobacterium* spp. où cette résistance est souvent décrite (119), la CMI du métronidazole a été déterminée après la vérification de l'identification de la souche et de l'incubation correcte en anaérobiose (une fausse résistance au métronidazole pouvant être liée à un défaut d'anaérobiose)
- pour les souches de 2014, en cas de diminution du diamètre de l'ertapénème (diamètre < 26 mm), les CMI de l'imipénème, du mérépénème et du doripénème ont été déterminées.

L'étude des CMI était réalisée par la méthode Etest<sup>®</sup> (bioMérieux) selon les recommandations du fournisseur. Les conditions de subculture étaient identiques à la méthode de diffusion. La CMI était lue à l'intersection de la zone d'inhibition de croissance bactérienne avec l'échelle graduée de la bandelette Etest. . Les souches étaient catégorisées selon les données du CA-SFM 2013 (42) (Tableau 13).

**Tableau 13. Concentrations critiques de catégorisation clinique du CA SFM 2013.**

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)	
	Sensible	Résistant
Métronidazole	$\leq 4$	$> 4$
Imipénème	$\leq 2$	$> 8$
Méropénème	$\leq 2$	$> 8$
Doripénème	$\leq 1$	$> 1$

#### **4. Détection des gènes de résistance**

La recherche des gènes de résistance par biologie moléculaire était effectuée pour les souches isolées en 2014.

La recherche des gènes *nim* était réalisée pour les souches pour lesquelles une CMI par Etest<sup>®</sup> au métronidazole était supérieure à 4 mg/L. Cette recherche était réalisée par PCR en utilisant les amorces *nim3* : 5' ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG 3' *nim5* : 5' GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC 3' selon les conditions d'amplification décrites par Trinh et al. (65). La présence d'un produit de PCR de 458 paires de bases était considérée comme positive. Des témoins positifs et négatifs étaient systématiquement utilisés pour validation de l'analyse.

Une PCR à la recherche du gène *cfiA* était effectuée pour les souches de *B. fragilis* et de *B. thetaiotaomicron* ayant des diamètres de l'értapénème  $< 26$  mm. La détection du gène *cfiA* a été faite selon la méthode décrite par Soki et al.(99) en utilisant les amorces *cfia1* : 5' CCA TGC TTT TCC CTG TCG CAG 3' et *cfia2* : 5' GGG CTA TGG CTT TGA AGT GC 3'. La présence du produit d'un produit de PCR de 726 paires de bases était considérée comme positive.

#### **D. Etude statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2010 (version 14.0.7153.5000) à l'aide de l'utilitaire d'analyse « Analysis ToolPaak ». Les comparaisons de pourcentages entre 2010 et 2014 ont été effectuées avec le test  $\chi^2$  ou le test

exact de Fisher avec une erreur alpha de 0,05. Les résultats sont exprimés en pourcentages +/- erreur standard.

### III. Résultats

#### A. Epidémiologie locale des hémocultures à bactéries anaérobies

En 2010, 68540 flacons d'hémocultures ont été analysés au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy dont 6392 (soit 9,33 %) se sont révélés positifs. Parmi les flacons positifs, les bactéries anaérobies ont été isolées dans 172 flacons (2,69%). Parmi 63452 flacons d'hémocultures analysés en 2014, 5564 étaient positifs, soit 8,77 %, dont 149 (2,67%) à au moins une bactérie anaérobie. Il n'y a pas eu de différence significative entre le taux d'hémocultures positives à anaérobies en 2010 et en 2014 ( $p=0,965$ ).

Les hémocultures représentaient, en 2010, 8,44 % de l'ensemble des prélèvements dans lesquels au moins une bactérie anaérobie a été isolée. Cette proportion était de 6,71 % en 2014.

Les caractéristiques de la population étaient similaires en 2010 et en 2014 (Tableau 14). Au total, l'âge moyen des 245 patients avec des hémocultures à anaérobies était de 59,2 ans (de 3 mois à 93 ans), 58,8% de patients était de sexe masculin. 46,5% d'hémocultures était prélevée < 48 heures après l'admission et 53,5% après 48 heures. La date d'admission n'était pas disponible pour 27 patients.

**Tableau 14. Caractéristiques de la population en 2010 et 2014**

	2010	2014
Patients (n)	130	115
Hommes (%)	57,7	60,1
Femmes (%)	42,3	39,9
Age moyen (ans)	57,9	60,6

L'origine du service du patient était connue pour 129 patients (99,2%) en 2010 et pour 111 patients (96,5%) en 2014 (Tableau 15). La majorité de patients étaient hospitalisés dans des services de chirurgie (33,8% et 27% en 2010 et en 2014, respectivement), des services

traitant les pathologies cancéreuses (15,4% et 19,1%), des unités de soins intensifs (13,8% et 10,4%) et de services des urgences (11,5% et 20,9%). Parmi les patients hospitalisés en chirurgie, la majorité provenait de services de chirurgie digestive (31,8% et 32,3%).

**Tableau 15. Répartition de l'origine des services des patients.**

Type de service	Répartition (%)	
	2010	2014
Chirurgie	33,8	27
-Chirurgie digestive	31,8	32,3
Pathologies cancéreuses	15,4	19,1
- tumeurs solides		
- onco-hématologie	75	90,9
	25	9,1
Unités de soins intensifs	13,8	10,4
Urgences	11,5	20,9
Maladies infectieuses	3,1	4,3
Hépto-gastro-entérologie		
Unité Médecine interne d'orientation digestive	8,5	4,5
Urologie	2,3	0
Autres	10,8	11,3
Inconnu	0,8	3,5

En 2010, 225 isolats anaérobies ont été isolés à partir de 172 flacons d'hémocultures positifs (70 isolats étaient associés dans des hémocultures polymicrobiennes). Les espèces les plus fréquemment isolées étaient : *Bacteroides* du groupe *fragilis* (87/225 soit 38,7%), dont particulièrement *Bacteroides fragilis* (47/225 soit 20,9%), *Fusobacterium* spp. (26/225 soit 11,6%) et *Clostridium* spp. (21/225 soit 9,3%) (Tableau 16). *Propionibacterium acnes* était isolé dans 15 hémocultures (6,7%) Les 70 isolats provenant d'hémocultures polymicrobiennes étaient le plus souvent associés avec les staphylocoques (18/70 soit 25,7%), les entérobactéries (16/70 soit 22,9%), particulièrement *Escherichia coli* (12,9%), les streptocoques (18,6%) et les entérocoques (11,4%). Seulement 10 hémocultures polymicrobiennes (5,8%) associaient uniquement les espèces anaérobies (Tableau 17).

En 2014, 166 isolats anaérobies ont été isolés à partir de 149 flacons d'hémocultures positifs (56 isolats étaient associés dans des hémocultures polymicrobiennes). Les espèces les plus fréquemment isolées étaient également: *Bacteroides* du groupe *fragilis* (56/166 soit 33,7%), dont particulièrement *Bacteroides fragilis* (37/166 soit 22,3%), les *Clostridium* spp. (22/166 soit 13,3%) et les autres bacilles à Gram positif (21/166 soit 12,7%) (Tableau 16). *Propionibacterium acnes* était isolé dans 20 hémocultures (12,7%) chez 17 patients dont seulement 2 avaient plusieurs flacons consécutifs positifs à *P. acnes*. Les bactéries aérobies associées dans les hémocultures polymicrobiennes étaient majoritairement des entérobactéries (16/56 soit 28,6%) et des staphylocoques (10/56 soit 17,9%). Sur les 47 flacons contenant plusieurs espèces (31,5%), seulement 6 flacons (4%) contenaient uniquement des bactéries anaérobies (Tableau 17).

**Tableau 16. Bactéries anaérobies isolées dans les flacons d'hémocultures en 2010 et en 2014.**

Bactéries isolées	Proportion (%)	
	2010	2014
<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>	38,7	33,7
<i>Fusobacterium</i> spp.	11,6	6,6
<i>Clostridium</i> spp.	9,3	13,3
Cocci à Gram positif	8	6
<i>Propionibacterium</i> spp.	7,1	12,7
<i>Eggerthella</i> spp.	4,4	3
<i>Prevotella</i> spp.	4	4,8
<i>Veillonella</i> spp.	3,6	1,2
Autres Bacilles à Gram négatif	4,4	6,6
Autres Bacilles à Gram positif	8,9	12,7

**Tableau 17. Caractéristiques des bactériémies polymicrobiennes**

		Proportion (%)	
		2010	2014
<b>Polymicrobiens, association mixte aérobie et anaérobie</b>		29,7	27,5
<b>Polymicrobiens, anaérobies uniquement</b>		5,8	4
<b>Nombre de bactéries anaérobies par flacon</b>	1	84,9	91,3
	2	8,7	6,7
	3	3,5	1,3
	≥4	2,9	0,7
<b>Bactéries aérobies associées</b>	Entérobactéries	22,9	28,6
	<i>Staphylococcus</i> spp.	25,7	17,9
	<i>Streptococcus</i> spp.	18,6	10,7
	<i>Enterococcus</i> spp.	11,4	16,1

## **B. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies**

La sensibilité aux antibiotiques a été testée pour 167 souches en 2010 et 123 souches en 2014. L'analyse des résultats a été conduite sur les groupes bactériens suivants : *Bacteroides* et *Parabacteroides* spp. *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. et autres bacilles à Gram négatif, *Clostridium* spp., bacilles à Gram positif non sporulant et cocci anaérobies (43). Le nombre de souches et la comparaison des pourcentages de sensibilité en 2010 et 2014 sont représentés dans le Tableau 18.

En 2010, la recherche de  $\beta$ -lactamase a été positive pour 5,3%(1/19) des *Fusobacterium* spp. et 50%(4/8) des *Prevotella* spp. Toutes les souches de *Clostridium* spp. (7) et de *Porphyromonas* spp.(2) testées ne présentaient pas d'activité  $\beta$ -lactamase. En 2014, la recherche de  $\beta$ -lactamase a été positive pour 85,7 %(6/7) des *Prevotella* spp. Toutes les souches de *Fusobacterium* spp.(9) , *Clostridium* spp. (2) et de *Porphyromonas* spp.(1) testées ne présentaient pas d'activité  $\beta$ -lactamase.

**Tableau 18. Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques de différents groupes de bactéries anaérobies isolées d'hémocultures en 2010 et en 2014.**

Organisme	Souches sensibles (%)		Valeur-p
	2010	2014	
<b><i>Bacteroides</i> et <i>Parabacteroides</i> spp.</b>	n=68	n=44	
amoxicilline	0	0	NS
amoxicilline/acide clavulanique	83,8	88,6	NS
pipéracilline/tazobactam	91,2	90,9	NS
céfoxitine	56,7	68,2	NS
imipénème	95,6	93,2	NS
clindamycine	23,5	15,9	NS
métronidazole	100	100	NS
moxifloxacine	63,2	76,7	NS
<b><i>B. fragilis</i></b>	n=32	n=27	
amoxicilline	0	0	NS
amoxicilline/acide clavulanique	93,8	85,2	NS
pipéracilline/tazobactam	93,8	85,2	NS
céfoxitine	68,8	70,4	NS
imipénème	93,8	88,9	NS
clindamycine	18,8	14,8	NS
métronidazole	100	100	NS
moxifloxacine	68,8	84,6	NS
<b><i>Bacteroides</i> et <i>Parabacteroides</i> spp. sans <i>B. fragilis</i></b>	n=36	n=17	
amoxicilline	0	0	NS
amoxicilline/acide clavulanique	77,8	94,1	NS
pipéracilline/tazobactam	97,2	100	NS
céfoxitine	45,7	58,8	NS
imipénème	97,2	100	NS
clindamycine	27,8	17,6	NS
métronidazole	100	100	NS
moxifloxacine	58,3	64,7	NS

Organisme	Souches sensibles (%)		Valeur-p
	2010	2014	
<b><i>Fusobacterium spp.</i></b>	n=19	n=9	
amoxicilline	94,7	100	NS
amoxicilline/acide clavulanique	94,7	100	NS
pipéracilline/tazobactam	94,7	100	NS
céfoxitine	94,7	100	NS
imipénème	94,7	100	NS
clindamycine	100	100	NS
métronidazole	100	100	NS
moxifloxacine	100	100	NS
<b><i>Prevotella spp. et autres bacilles à Gram négatif</i></b>	n=16	n=12	
amoxicilline	62,5	25	0,047
amoxicilline/acide clavulanique	87,5	100	NS
pipéracilline/tazobactam	87,5	100	NS
céfoxitine	85,7	75	NS
imipénème	100	100	NS
clindamycine	78,6	41,7	NS
métronidazole	87,5	100	NS
moxifloxacine	93,8	50	0,023
<b><i>Clostridium spp.</i></b>	n=19	n=20	
amoxicilline	100	100	NS
amoxicilline/acide clavulanique	100	100	NS
pipéracilline/tazobactam	100	100	NS
céfoxitine	/	/	NA
imipénème	100	95	NS
clindamycine	36,8	65	NS
métronidazole	87,5	100	NS
moxifloxacine	31,6	85	0,001



Organisme	Souches sensibles (%)		Valeur-p
	2010	2014	
<b>Bacilles à Gram positif non sporulant</b>	n=21	n=27	
amoxicilline	100	100	NS
amoxicilline/acide clavulanique	100	100	NS
pipéracilline/tazobactam	100	100	NS
céfoxitine	/	/	NA
imipénème	100	100	NS
clindamycine	81	85,2	NS
métronidazole	66,7	34,6	0,027
moxifloxacine	71,4	70,4	NS
<b>Cocci anaérobies</b>	n=23	n=11	
amoxicilline	95,7	100	NS
amoxicilline/acide clavulanique	95,7	100	NS
pipéracilline/tazobactam	78,3	100	NS
céfoxitine	85,7	100	NS
imipénème	95,5	100	NS
clindamycine	86,4	90,3	NS
métronidazole	100	100	NS
moxifloxacine	78,3	81,8	NS
<b>Toutes les souches</b>	n=167	n=123	
amoxicilline	54,5	56,9	NS
amoxicilline/acide clavulanique	89,5	95,9	0,022
pipéracilline/tazobactam	92,5	96,7	NS
céfoxitine	69,2	88,5	0,001
imipénème	96	96,7	NS
clindamycine	49,6	54,5	NS
métronidazole	94	86	0,010
moxifloxacine	69,9	76,2	NS

NS : non significatif NA : non applicable

L'amoxicilline + acide clavulanique présente une activité sur la majorité de souches anaérobies. Une augmentation du taux de sensibilité a été constaté entre 2010 et 2014 (89,5% versus 95,9%, respectivement,  $p=0,022$ ). Cette augmentation a plus particulièrement concerné les souches de *Prevotella* spp. et *Bacteroides* spp. hormis *B. fragilis*.

Plus de 90% de l'ensemble de souches étaient sensibles à la piperacilline-tazobactam et plus de 95% présentaient une sensibilité à l'imipénème.

La céfoxitine était active sur 69,2 % de souches en 2010 et sur 88,5 % de souches en 2014 ( $p=0,001$ ).

Le métronidazole a vu son activité diminuée sur l'ensemble des souches entre 2010 et 2014 (94% versus 86%, respectivement ;  $p<0,01$ ). Les taux de sensibilité sont variables en fonction des isolats bactériens (Tableau 19). La diminution de l'activité du métronidazole est observée sur les souches de Gram positif (85,5% versus 69,1%, respectivement ;  $p<0,04$ ) et plus particulièrement sur les bacilles à Gram positif non sporulant (66,7% contre 34,6% ;  $p < 0,027$ ). Ce groupe bactérien est composé de souches d'*Actinomyces* spp. et *Propionibacterium* spp. naturellement résistantes au métronidazole. En excluant ces souches, il n'y a pas eu de diminution significative de l'activité du métronidazole sur l'ensemble des souches entre 2010 et 2014 (95,1% et 96,3% respectivement ;  $p > 0,05$ ).

**Tableau 19. Sensibilité au métronidazole des souches de 2010 et 2014**

Organisme	Sensibilité (%)		Valeur p
	2010	2014	
Toutes les souches	94	86	0,01
Toutes les bactéries à Gram négatif	98,2	100	NS
Toutes les bactéries à Gram positif	85,5	69,1	0,040
Bacilles à Gram positif non sporulant	66,7	34,6	0,027
Bacilles à Gram positif non sporulant sans <i>Actinomyces</i> spp. et <i>Propionibacterium</i> spp.	87,5	69,2	NS
Toutes les souches sans <i>Actinomyces</i> spp. et <i>Propionibacterium</i> spp.	95,1	96,3	NS

La moxifloxacine était active sur environ 70% de souches analysées. Le taux de sensibilité à la clindamycine a été le plus faible, environ 50%. Il n'y a pas eu de différences significatives de sensibilité pour ces molécules entre 2010 et 2014.

Parmi les bactéries anaérobies, *Bacteroides* et *Parabacteroides* spp. présentaient le plus de résistances aux antibiotiques, mais il n'y a pas eu de différence significative de taux de résistances entre 2010 et 2014 ( $p > 0,05$ ). Pour l'ensemble de souches analysées en 2010 et en 2014, le plus fort taux de résistance concernait la clindamycine (23,5% et 15,9%, respectivement) et la céfoxitine (56,7% et 68,2%, respectivement). La résistance à la céfoxitine est notamment très élevée parmi les souches de *B. thetaiotaomicron* (80% des souches en 2010 et 60% en 2014). Un taux de résistance modéré a été observé pour les associations pénicillines + inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase (sensibilités de 83,8% et 88,6% pour amoxicilline + acide clavulanique, 91,2% et 90,9% pour pipéracilline + tazobactam en 2010 et 2014, respectivement). L'imipénème et le métronidazole conservaient une excellente activité ( $> 92\%$  et  $100\%$  respectivement). *B. fragilis* présentait une sensibilité plus importante que les autres *Bacteroides* spp. à la céfoxitine (68,8% de souches sensibles contre 45,7%, respectivement en 2010) et à la moxifloxacine (68,8% contre 58,3%, respectivement, en 2010). Cependant, *B. fragilis* a été moins sensible que les autres *Bacteroides* spp. à la clindamycine (18,8% contre 27,8%, respectivement, en 2014) et à l'imipénème (88,9% contre 100%, respectivement, en 2014). Parmi trois souches résistantes à l'imipénème en 2014, toutes présentaient des CMI élevées aux carbapénèmes mis à part une souche qui avait une sensibilité intermédiaire au doripénème (Tableau 20). Le gène *cfiA* a été retrouvé chez les trois souches. Ces trois souches étaient résistantes à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines.

**Tableau 20. CMI des carbapénèmes de trois souches de *B. fragilis* résistantes à l'imipénème et présence du gène *cfiA*.**

Souches	Imipénème (mg/L)	Doripénème (mg/L)	Méropénème (mg/L)	Gène <i>cfiA</i>
1	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 32$	Présent
2	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 32$	Présent
3	$\geq 32$	3	12	Présent

Parmi les souches de *Prevotella* spp., on a constaté une diminution de taux de sensibilité à l'amoxicilline (62,5% en 2010 *versus* 25% en 2014 ;  $p=0,047$ ) et à la moxifloxacine (93,8% en 2010 *versus* 50% en 2014;  $p=0,023$ ).

Les *Fusobacterium* spp. restaient très sensibles à l'ensemble des antibiotiques (> 90% de sensibilité). Il en était de même pour les cocci anaérobies, et plus particulièrement les cocci à Gram positif qui présentaient  $\geq 95\%$  de sensibilité à l'ensemble des antibiotiques.

Les  $\beta$ -lactamines ont conservé une excellente activité sur les *Clostridium* spp. ( $\geq 95\%$  des souches sensibles). Seulement 36,1% de ces souches présentaient une sensibilité à la moxifloxacine en 2010, tandis qu'en 2014 ce taux atteignait 85% ( $p < 0,001$ ).

#### IV. Discussion

La proportion d'hémocultures à bactéries anaérobies au CHU de Nancy est restée stable entre 2010 et 2014, atteignant environ 2,7%. Cette proportion est inférieure aux moyennes nationales et internationales (environ 4%) qui sont cependant variables selon les populations étudiées (14,21,23). Cependant, ces chiffres ne permettent pas d'apprécier l'incidence réelle des bactériémies anaérobies, ce type d'estimation étant uniquement possible par une approche populationnelle (17, 25).

Notre étude retrouve les facteurs de risque de bactériémies anaérobies cités dans la littérature, tels que l'âge avancé, une pathologie tumorale ou une intervention chirurgicale. En effet, l'âge moyen des patients était proche de 60 ans (médiane : 64 ans) (25). A l'instar d'autres études, une proportion importante des patients de notre étude provenait des services de cancérologie, d'hématologie ou de chirurgie digestive (2,6,134–136). Les données cliniques, le diagnostic et les comorbidités des patients n'étant pas disponibles, une étude approfondie des facteurs de survenue des bactériémies anaérobies n'était pas possible.

Dans notre étude, la moitié d'hémocultures à bactéries anaérobies en 2010 et en 2014 était prélevée avant 48 heures d'hospitalisation, suggérant une origine communautaire des bactériémies. Cette donnée est supérieure à celle retrouvée par d'autres études qui mettent en évidence une origine nosocomiale dans environ 65% de cas, et dans lesquelles l'hospitalisation a été considérée comme un facteur de risque de bactériémies anaérobies (21,22). Cependant dans notre étude seule la dernière date d'admission étant disponible, un contact récent des patients avec des structures de soins n'a pu être vérifié. C'est pourquoi, il reste difficile d'affirmer l'origine communautaire ou nosocomiale des bactériémies.

Comme rapporté dans de nombreuses études (18,20,21,26,137), les *Bacteroides* du groupe *fragilis* constituaient les isolats les plus fréquents. Le deuxième genre le plus fréquemment isolé en 2014 était *Clostridium* spp., confirmant les données de la littérature. Ce genre se situait en 3<sup>ème</sup> position en termes de fréquence en 2010, précédé par *Fusobacterium* spp. Dans notre étude nous avons noté une fréquence élevée de bactériémies polymicrobiennes (35,5% en 2010 et 31,5% en 2014). Cette forte proportion n'est pas toujours retrouvée dans d'autres études (18,21). Ces résultats peuvent être expliqués par la population étudiée. En effet, comme mentionné précédemment, une forte proportion de patients dans notre étude provenait de services de chirurgie digestive, exposant particulièrement aux bactériémies issues de la flore intestinale (138,139). *Propionibacterium acnes*, considéré souvent comme contaminant d'hémocultures, était retrouvé dans notre étude avec une fréquence relativement élevée (7,1 % en 2010 et 12,7% en 2014). Cette proportion est nettement supérieure aux chiffres rapportés par d'autres auteurs (0,4 – 4,5%), suggérant un taux de contaminations d'hémocultures élevé dans notre série. Cependant, une étude récente portant sur l'ensemble des hémocultures prélevées sur une période de 9 ans (2005-2014) au CHRU de Nancy montrait une proportion de contaminants potentiels d'hémocultures (staphylocoques à coagulase négative, streptocoques « viridans » etc.) proche de 3% (140). Ce pourcentage représente un taux conforme aux objectifs fixés dans la littérature (141). Il serait donc intéressant d'explorer la signification clinique des *Propionibacterium acnes* retrouvés dans notre étude.

Concernant les profils de sensibilité aux antibiotiques, les *Bacteroides* du groupe *fragilis* présentaient le plus fort taux de résistances, conformément aux données européennes et américaines (85,105). Ainsi, une résistance à l'association amoxicilline + acide

clavulanique a été observée pour environ 15% de souches. Ce taux est supérieur aux dernières données françaises rapportant une proportion de souches résistantes de l'ordre de 5 – 8% (47,88,92). Compte tenu de ces résultats, l'utilisation empirique de l'amoxicilline-acide clavulanique devra probablement être remise en question dans les années à venir. En effet, malgré l'absence d'évolution de taux de résistance entre 2010 et 2014 dans notre étude, une augmentation de résistance a été notée depuis 15 ans dans de nombreux pays (142). Elle est liée à l'acquisition d'une séquence d'insertion (IS1124) en amont du gène de  $\beta$ -lactamase *cepA* associée à des degrés divers à des pertes de porines (67). L'association pipéracilline + tazobactam présentait dans notre étude une meilleure activité (91% de souches sensibles en 2010 et 2014). Cette activité était pourtant plus faible que celle rapportée par d'autres auteurs (97% de souches sensibles en moyenne) (85,86,94,105,142). Cette différence peut s'expliquer par les référentiels utilisés pour la catégorisation clinique des résultats des CMI. En effet, les concentrations critiques pour la pipéracilline-tazobactam du CLSI sont nettement plus élevées que celles préconisées par l'EUCAST ou le CA-SFM. Une autre explication pourrait être liée à l'utilisation de la méthode de diffusion qui pourrait induire une catégorisation d'un certain nombre de souches comme intermédiaires. En effet, selon une étude récente de Nagy et al. (62), des diamètres < 25 mm ne permettent pas de différencier avec certitude les souches sensibles des souches intermédiaires. Pour ces isolats, les auteurs préconisent la détermination de la CMI. Dans notre étude, 3 souches isolées en 2010 et 4 souches isolées en 2014 présentaient un diamètre < 25 mm. Une révision des algorithmes utilisés dans le Service de Bactériologie du CHRU de Nancy devra être envisagée, suivant les évolutions prochaines des recommandations du CA-SFM/EUCAST.

Les études récentes ont rapporté une résistance à la céfoxitine en moyenne de 10 à 20% en Europe, et notamment en France (47,85,92,94). Seule l'étude réalisée en Belgique par Wybo et al. (43) retrouve des résultats similaires (56% de souches sensible) à ceux observés dans notre étude (56,7% en 2010 et 68,2% en 2014). De la même manière, on observe que les souches de *B. fragilis* sont plus sensibles que les autres souches de *Bacteroides* et de *Parabacteroides* spp. Ceci peut être notamment expliqué par une forte proportion dans notre étude d'isolats de *B. thetaiotaomicron*, connus comme étant très résistants à la céfoxitine (85).

Une faible proportion de souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* présentait une résistance aux carbapénèmes (7% en 2010 et 5% en 2014). Ces résultats sont proches de ceux de deux études européennes (43,101). D'autres travaux américains, européens et asiatiques rapportent des taux compris entre 0,6 et 5% (85,86,93,94,103,105). La résistance à haut

niveau aux carbapénèmes des trois souches de *B. fragilis* isolées en 2014 était liée à la présence du gène *cfiA*. Pour les 3 souches isolées en 2010, des données informatiques manquantes ont empêché l'analyse des résultats. Un dépistage systématique de la sensibilité diminuée aux carbapénèmes et la recherche du gène *cfiA* restent donc indispensables dans le protocole de surveillance mis en place dans le Service de Bactériologie.

Les souches de *Bacteroides* et *Parabacteroides* spp. ont des taux de résistance très élevés à la clindamycine (76,5 en 2010 et 84,1 % en 2014). Bien que cette résistance soit en forte augmentation dans de nombreux pays depuis une vingtaine d'années, les taux évoqués dans la littérature sont inférieurs : entre 30 à 40% des souches résistantes (85,86,94,105). Une hypothèse évoquée pour expliquer cette différence est le nombre important de souches ayant un diamètre de zone d'inhibition proche de la zone décisionnelle (15mm). Or Nagy et al. (62) ont montré que l'utilisation d'un disque de clindamycine chargé à 10 µg au lieu de 2µg permettait une meilleure séparation des souches résistantes. Ici encore une révision de l'algorithme suite aux nouvelles préconisations du CA-SFM/EUCAST devra être envisagée.

La résistance au métronidazole des souches de *Bacteroides* spp. reste rare malgré sa large utilisation depuis les années 1960 dans le traitement des infections à bactéries anaérobies et notamment des *Bacteroides* du groupe *fragilis* (143). Cette résistance au métronidazole est liée dans la majorité des cas à la présence d'un gène *nim*. Or ces gènes sont pour la plupart situés sur des plasmides conjugatifs qui hébergent également les gènes de résistance à la clindamycine (144). Malgré cette large utilisation du métronidazole, le taux de résistance reste très faible, entre 0 et 1% dans la plupart des études (43,62,94,105) comme dans ce travail (aucune souche n'a été retrouvée résistante). Il faut noter cependant, qu'il existe des souches de sensibilité diminuée au métronidazole (CMI comprises entre 8 et 16 mg/L) qui ne sont détectées qu'après plusieurs jours d'incubation et qui ont été à l'origine de rares échecs cliniques (67). Il faut préciser que le délai d'incubation pour le métronidazole était systématiquement prolongé au-delà de 48 heures (au minimum 96 heures voire plus) et qu'aucune souche de sensibilité diminuée au métronidazole parmi les souches isolées n'a été détectée.

Les *Fusobacterium* spp. étudiés étaient très sensibles aux différents antibiotiques avec une production de pénicillinase dans une faible proportion des cas (5,3%) comme décrit dans la littérature (88,145). On observe une diminution significative de l'activité de l'amoxicilline entre 2010 et 2014 pour les souches de *Prevotella* spp. et les autres bacilles à Gram négatif.

Ce phénomène a été retrouvé dans d'autres études (103,146). Nous avons retrouvé notamment plus de souches de *Prevotella* spp. sécrétrices de  $\beta$ -lactamase en 2014 (85,7%) qu'en 2010 (50%). Ceci s'explique cependant en partie par une répartition différente des espèces de *Prevotella* spp. Nous avons notamment rapporté plus de *Prevotella* pigmentées (*P. denticola*, *P. melaninogenica*) en 2014 (3/7 souches) qu'en 2010 (1/8 souches). Or, les *Prevotella* pigmentées présentent une résistance plus marquée à l'amoxicilline (145). De plus, la population des autres bacilles à Gram négatif n'était pas identique en 2010 et en 2014. On retrouve ainsi 3 souches d'*Alistipes* spp. en 2014 présentant toutes une résistance à l'amoxicilline tandis que 3 souches de *Dialister* spp., très sensibles à l'amoxicilline (88), ont été isolées en 2010. L'ensemble des autres  $\beta$ -lactamines sont restées très actives. Par contre, nous avons observé une diminution de la sensibilité à la clindamycine. Ce phénomène a également été retrouvé par Wybo et al. (43).

Les souches de *Clostridium* spp. et les autres bacilles à Gram positif de l'étude se sont révélées très sensibles aux  $\beta$ -lactamines. La sensibilité à l'amoxicilline était supérieure à celle rapportée dans certaines publications (43). La résistance à la clindamycine était plus importante pour *Clostridium* spp. et notamment pour les souches de 2010. On a observé alors un plus grand nombre de souches de *C. ramosum* (6 souches en 2010 versus 1 souche en 2014) qui toutes présentaient une résistance à la clindamycine. La diminution significative de la sensibilité au métronidazole des bacilles à Gram positif non sporulant était expliquée par l'abondance de souches d'*Actinomyces* spp. et de *Propionibacterium* spp. isolées en 2014. En effet, ces espèces étant naturellement résistantes au métronidazole, leur exclusion annule la différence de sensibilité observée entre 2010 et 2014.

En accord avec les données de la littérature, une grande sensibilité des cocci anaérobies a été retrouvée dans notre travail (43,117,118,147). On note cependant la présence de 21,7% de souches de sensibilité diminuée à la pipéracilline + tazobactam en 2010 alors que toutes les souches de 2014 étaient sensibles. Ceci s'explique par la présence de 6 souches de *Veillonella* spp. dans les hémocultures de 2010 (1 souche en 2014). En effet, il a été rapporté que chez certaines souches de *Veillonella* spp. présentaient une résistance à la ticarcilline et la pipéracilline (associées ou non à un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase) et qu'elles demeuraient sensibles à l'amoxicilline (88). Le mécanisme exact de cette résistance n'est toujours pas connu. Les taux de résistance à la clindamycine, au métronidazole et à la moxifloxacine sont similaires à ceux retrouvés dans les quelques études faites concernant ce groupe bactérien (43,117,118,147).



La multirésistance est définie comme une résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques (142). L'augmentation de la résistance à la clindamycine et à la moxifloxacine, associée à la résistance aux  $\beta$ -lactamines classe de nombreuses souches anaérobies parmi les bactéries multirésistantes. Ainsi, selon Karlowsky et al. (105), 24,3% des *Bacteroides* du groupe *fragilis* présentent une multirésistance. Cependant, les résistances faisant craindre des échecs thérapeutiques concernent le métronidazole associée à d'autres familles d'antibiotiques. De nombreuses études ont décrit de telles souches parmi les *B.* du groupe *fragilis* (70,148,149) et parmi les *Prevotella* spp. Des éléments génétiques mobiles tels que des transposons sont impliquées dans ces phénomènes de multirésistance (150). Parmi les isolats de notre étude, aucune souche ne présentait ce type de multirésistance. Les trois souches de *B. fragilis* produisant une carbapénémase ne présentaient pas de résistance associée à d'autres familles d'antibiotiques (métronidazole, clindamycine, moxifloxacine).

Une limite de ce travail est l'utilisation de la méthode de diffusion avec disques. La méthode de diffusion n'est pas recommandée par la CLSI (25). Cependant, elle est largement utilisée en routine en France et le CA-SFM propose des diamètres critiques (42). De plus, cette méthode est à l'étude dans des publications récentes européennes pour valider son utilisation en routine sur les bactéries anaérobies à croissance rapide comme *Bacteroides* spp. et *Clostridium* spp. (62,64). Cette méthode permet de différencier de manière fiable les souches résistantes à haut niveau des souches sensibles. Néanmoins, une diminution de sensibilité détectée par diffusion doit être confirmée par une étude de la CMI.

## Conclusion

Les bactériémies à bactéries anaérobies restent relativement peu fréquentes mais elles comprennent majoritairement des bactéries au pouvoir invasif important comme les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et les *Clostridium* spp. De plus, ces bactériémies sont souvent polymicrobiennes en association avec des bactéries aérobies rendant leur traitement plus difficile.

Dans notre étude, la répartition des isolats en fonction des espèces et le profil des patients ayant une bactériémie étaient similaires à ceux rapportés dans la littérature. Nous avons montré que la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies avait peu évolué entre 2010 et 2014 au CHU de Nancy excepté une diminution de l'activité de la clindamycine et de la moxifloxacine sur les *Prevotella* spp. et autres bacilles à gram négatif. On observe également un taux de sensibilité très bas de la clindamycine particulièrement pour ce qui concerne les *Bacteroides* et *Parabacteroides* spp. Nous avons également observé un taux relativement élevés de *Bacteroides* du groupe *fragilis* résistants à l'amoxicilline- acide clavulanique. La pipéracilline associée au tazobactam et l'imipénème restent des molécules très actives contre les bactéries anaérobies bien que des souches résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines existent. Le métronidazole, molécule anti-anaérobie par excellence, reste très actif sur l'ensemble des bactéries anaérobies : aucune souche de *Bacteroides* du groupe *fragilis* n'a été retrouvée résistante. Ces trois dernières molécules restent des antibiotiques de choix pour le traitement des bactériémies.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Loesche WJ. Oxygen Sensitivity of Various Anaerobic Bacteria. *Appl Microbiol.* 1969 Nov;18(5):723–7.
2. Dubreuil L, Sédallian A. Généralités sur les bactéries anaérobies. In: *Précis de bactériologie clinique.* Eska. Paris; 2007. p. 1631–46.
3. Grollier G, Le Moal G, Robert R. Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (*Clostridium difficile* et *Actinomyces* spp exclues). 2005;
4. Hentges DJ. The Anaerobic Microflora of the Human Body. *Clin Infect Dis.* 1993 Jun 1;16(Supplement 4):S175–80.
5. Michon AL, Dubreuil L, Marchandin H. Bactéries anaérobies : généralités. [Article 90-05-0035-A]. EMC - Biologie médicale. 2015.
6. Kienlen J. Les infections à anaérobies. *Conférences Actual.* 2003;597–614.
7. Brook I. Anaerobic bacteria in upper respiratory tract and head and neck infections: Microbiology and treatment. *Anaerobe.* 2012 Apr;18(2):214–20.
8. Finegold SM. Anaerobic infections in humans: an overview. *Anaerobe.* 1995 Feb;1(1):3–9.
9. Brook I. The role of anaerobic bacteria in sinusitis. *Anaerobe.* 2006 Feb;12(1):5–12.
10. Brook I. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: Implications for medical therapy. *Anaerobe.* 2008 Dec;14(6):297–300.
11. Brook I. Anaerobic bacterial bacteremia: 12-year experience in two military hospitals. *J Infect Dis.* 1989 Dec;160(6):1071–5.
12. Bartlett JG. Anaerobic bacterial infection of the lung. *Anaerobe.* 2012 Apr;18(2):235–9.
13. Finegold SM. *Anaerobic Bacteria in Human Disease.* New-York: Academic Press; 1977.
14. Vena A, Muñoz P, Alcalá L, Fernandez-Cruz A, Sanchez C, Valerio M, et al. Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteremia really changing? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 May 28;1–9.
15. Fenner L, Widmer AF, Straub C, Frei R. Is the Incidence of Anaerobic Bacteremia Decreasing? Analysis of 114,000 Blood Cultures over a Ten-Year Period. *J Clin Microbiol.* 2008 Jul 1;46(7):2432–4.
16. Dorsher CW, Rosenblatt JE, Wilson WR, Ilstrup DM. Anaerobic bacteremia: decreasing rate over a 15-year period. *Rev Infect Dis.* 1991 Aug;13(4):633–6.

17. Gómez J, Baños V, Ruiz J, Herrero F, Pérez M, Pretel L, et al. Clinical significance of anaerobic bacteremias in a general hospital. *Clin Investig*. 1993 Aug 1;71(8):595–9.
18. Lombardi DP, Engleberg NC. Anaerobic bacteremia: incidence, patient characteristics, and clinical significance. *Am J Med*. 1992 Jan;92(1):53–60.
19. Grohs P, Mainardi J-L, Podglajen I, Hanras X, Eckert C, Buu-Hoï A, et al. Relevance of Routine Use of the Anaerobic Blood Culture Bottle. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2711–5.
20. Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of Anaerobic Bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2007 Apr 1;44(7):895–900.
21. Blairon L, De Gheldre Y, Delaere B, Sonet A, Bosly A, Glupczynski Y. A 62-month retrospective epidemiological survey of anaerobic bacteraemia in a university hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Jun;12(6):527–32.
22. Ngo JT, Parkins MD, Gregson DB, Pitout JDD, Ross T, Church DL, et al. Population-based assessment of the incidence, risk factors, and outcomes of anaerobic bloodstream infections. *Infection*. 2013 Feb;41(1):41–8.
23. Salonen JH, Eerola E, Meurman O. Clinical significance and outcome of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 1998;26(6):1413–7.
24. Goldstein EJ. Anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 1996;23(Supplement 1):S97–101.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A8. 8th ed. Wayne, PA: CLSI; 2012.
26. Brook I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe*. 2010 Jun;16(3):183–9.
27. Shoji K, Komuro H, Watanabe Y, Miyairi I. The utility of anaerobic blood culture in detecting facultative anaerobic bacteremia in children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Aug;76(4):409–12.
28. Wilson JR, Limaye AP. Risk Factors For Mortality In Patients With Anaerobic Bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Apr 1;23(4):310–6.
29. Redondo MC, Arbo MDJ, Grindlinger J, Snyderman DR. Attributable Mortality of Bacteremia Associated with the *Bacteroides fragilis* Group. *Clin Infect Dis*. 1995 Jun 1;20(6):1492–6.
30. Noriega LM, Auwera PV der, Phan M, Daneau D, Meunier F, Gerain J, et al. Anaerobic bacteremia in a cancer center. *Support Care Cancer*. 1993 Sep 1;1(5):250–5.
31. Nguyen MH, Victor LY, Morris AJ, McDermott L, Wagener MW, Harrell L, et al. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis*. 2000;30(6):870–6.
32. REMIC 2015. Référentiel de microbiologie médicale.

33. Hecht DW. Routine Anaerobic Blood Cultures: Back Where We Started? *Clin Infect Dis*. 2007 Apr 1;44(7):901–3.
34. Park HJ, Na S, Park SY, Moon SM, Cho O-H, Park K-H, et al. Clinical Significance of *Propionibacterium acnes* Recovered from Blood Cultures: Analysis of 524 Episodes. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr 1;49(4):1598–601.
35. Ramos JM, García-Corbeira P, Fernández-Roblas R, Soriano F. [Bacteremia caused by anaerobes: analysis of 131 episodes]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 1994 Jan;12(1):9–16.
36. Wexler HM. Susceptibility testing of anaerobic bacteria: myth, magic, or method? *Clin Microbiol Rev*. 1991 Oct;4(4):470–84.
37. Hecht DW. Prevalence of Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: Worrisome Developments. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 1;39(1):92–7.
38. Goldstein EJC, Solomkin JS, Citron DM, Alder JD. Clinical Efficacy and Correlation of Clinical Outcomes With In Vitro Susceptibility for Anaerobic Bacteria in Patients With Complicated Intra-abdominal Infections Treated With Moxifloxacin. *Clin Infect Dis*. 2011 Dec 1;53(11):1074–80.
39. Wexler HM. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Oct;20(4):593–621.
40. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJC. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jul;26(3):526–46.
41. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015.
42. SFM (Société Française de Microbiologie)., editor. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2013.
43. Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O, Vekens E, Vandoorslaer K, Claeys G, et al. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jan;69(1):155–61.
44. Courvalin P, Leclercq R. *Antibiogramme*. Paris: Éd. Eska; 2012.
45. Fougnot S. Etude de l'activité des antibiotiques sur *Propionibacterium acnes* impliqué dans les infections neuro-méningés. *Henri Poincaré* 1; 2003.
46. Dubreuil L. Méthodes d'études des anaérobies. In: *Antibiogramme*. Paris: Éd. Eska; 2012. p. 623–36.
47. Mory F, Fougnot S, Lozniewski A. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies. *Rev Fr Lab*. 2003 Jun;2003(354):27–32.
48. Goldstein EJC, Citron DM, Goldman PJ, Goldman RJ. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. *Anaerobe*. 2008 Apr;14(2):68–72.

49. Hill GB, Schalkowsky S. Development and Evaluation of the Spiral Gradient Endpoint Method for Susceptibility Testing of Anaerobic Gram-Negative Bacilli. *Rev Infect Dis.* 1990 Jan 1;12(Supplement 2):S200–9.
50. Hill GB. Spiral gradient endpoint method compared to standard agar dilution for susceptibility testing of anaerobic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 1991 May 1;29(5):975–9.
51. Marty N, Agueda L, Carratala V, Chabanon G. [Evaluation of the Spiral method to determine the MIC of various antibiotics]. *Pathol Biol (Paris).* 1994 May;42(5):448–53.
52. Wexler HM, Molitoris E, Murray PR, Washington J, Zabransky RJ, Edelstein PH, et al. Comparison of spiral gradient endpoint and agar dilution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria: a multilaboratory collaborative evaluation. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan 1;34(1):170–4.
53. Schieven BC, Massey VE, Lannigan R, Hussain Z. Evaluation of Susceptibility of Anaerobic Organisms by the Etest and the Reference Agar Dilution Method. *Clin Infect Dis.* 1995 Jun 1;20(Supplement 2):S337–8.
54. Piérard D, De Meyer A, Rosseel P, Lauwers S. Use of the E-test for determining antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria. *Pathol Biol (Paris).* 1996 May;44(5):358–62.
55. Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995 Jul;22(3):279–84.
56. Hall G, Heimdahl A, Nord CE. Comparison of E Test and Agar Dilution Methods for Determining Antibiotic Susceptibilities of Anaerobic Bacteria and Viridans Streptococci Isolated from Blood. *Anaerobe.* 1998 Feb;4(1):29–33.
57. Rennie RP, Turnbull L, Brosnikoff C, Cloke J. First Comprehensive Evaluation of the M.I.C. Evaluator Device Compared to Etest and CLSI Reference Dilution Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Clinical Strains of Anaerobes and Other Fastidious Bacterial Species. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr 1;50(4):1153–7.
58. Croco JL, Erwin ME, Jennings JM, Putnam LR, Jones RN. Evaluation of the Etest for Determinations of Antimicrobial Spectrum and Potency Against Anaerobes Associated with Bacterial Vaginosis and Peritonitis. *Clin Infect Dis.* 1995 Jun 1;20(Supplement 2):S339–41.
59. Houcke I, Pagniez C, Segard-Roussel V, Dubreuil L. [Comparison of two routine techniques for the evaluation of the susceptibility to antibiotics of strict anaerobic bacteria: E test AB Biodisk and ATB ANA Biomerieux]. *Pathol Biol (Paris).* 1994 May;42(5):454–9.
60. Dubreuil L, Houcke I, Singer E. Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Evaluation of the Redesigned (Version 96) bioMérieux ATB ANA Device. *J Clin Microbiol.* 1999 Jun 1;37(6):1824–8.

61. Koru O, Ozyurt M. Determination of antimicrobial susceptibilities of clinically isolated anaerobic bacteria by E-test, ATB-ANA and agar dilution. *Anaerobe*. 2008 Jun;14(3):161–5.
62. Nagy E, Justesen US, Eitel Z, Urbán E. Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:65–71.
63. Luu H, Thomsen M, Hansen F, Citron D, Kahlmeter G, Justesen US. Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group using EUCAST clinical MIC breakpoints. Poster 1577; 2013; ECCMID.
64. Erikstrup LT, Danielsen TKL, Hall V, Olsen KEP, Kristensen B, Kahlmeter G, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Aug 1;18(8):E266–72.
65. Trinh S, Reysset G. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol*. 1996 Sep 1;34(9):2078–84.
66. Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible Metronidazole Resistance and *nim* Genes in Clinical *Bacteroides fragilis* Group Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Mar 1;49(3):1253–6.
67. Dubreuil L, Odou MF. Anaerobic bacteria and antibiotics: What kind of unexpected resistance could I find in my laboratory tomorrow? *Anaerobe*. 2010 Dec;16(6):555–9.
68. Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Jul 1;54(1):109–16.
69. Alauzet C, Mory F, Teyssier C, Hallage H, Carlier JP, Grollier G, et al. Metronidazole Resistance in *Prevotella* spp. and Description of a New *nim* Gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan 1;54(1):60–4.
70. Husain F, Veeranagouda Y, Hsi J, Meggersee R, Abratt V, Wexler HM. Two Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* Carry a Novel Metronidazole Resistance *nim* Gene (*nimJ*). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Aug;57(8):3767–74.
71. Schaumann R, Petzold S, Fille M, Rodloff AC. Inducible Metronidazole Resistance in *nim*-Positive and *nim*-Negative *Bacteroides fragilis* Group Strains after Several Passages Metronidazole Containing Columbia Agar Plates. *Infection*. 2005 Oct 1;33(5-6):368–72.
72. Roh KH, Kim S, Kim C-K, Yum JH, Kim MS, Yong D, et al. New *cfiA* variant and novel insertion sequence elements in carbapenem-resistant *Bacteroides fragilis* isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Apr;66(4):343–8.
73. Treviño M, Areses P, Dolores Peñalver M, Cortizo S, Pardo F, Luisa Pérez del Molino M, et al. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group and characterisation of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF. *Anaerobe*. 2012 Feb;18(1):37–43.

74. Pumbwe L, Chang A, Smith RL, Wexler HM. Clinical significance of overexpression of multiple RND-family efflux pumps in *Bacteroides fragilis* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Sep 1;58(3):543–8.
75. Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS, Miranda KR, Guimarães PLS, Santos-Filho J, et al. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe.* 2010 Jun;16(3):190–4.
76. Pumbwe L, Curzon M, Wexler HM. Rapid Multiplex Pcr Assay for Simultaneous Detection of Major Antibiotic Resistance Determinants in Clinical Isolates of *Bacteroides Fragilis*. *J Rapid Methods Autom Microbiol.* 2008 Dec 1;16(4):381–93.
77. Wybo I, Bel AD, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Cauwenbergh MV, et al. Differentiation of *cfiA*-Negative and *cfiA*-Positive *Bacteroides fragilis* Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011 May 1;49(5):1961–4.
78. Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M. Differentiation of division I (*cfiA*-negative) and division II (*cfiA*-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2011 Nov;60(Pt 11):1584–90.
79. Fenyvesi VS, Urbán E, Bartha N, Ábrók M, Kostrzewa M, Nagy E, et al. Use of MALDI-TOF/MS for routine detection of *cfiA* gene-positive *Bacteroides fragilis* strains. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Nov;44(5):474–5.
80. Johansson Å, Nagy E, Sóki J. Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption ionization – Time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe.* 2014 Apr;26:49–52.
81. Johansson Å, Nagy E, Sóki J. Instant screening and verification of carbapenemase activity in *Bacteroides fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2014 Aug;63(Pt 8):1105–10.
82. SFM (Société Française de Microbiologie)., editor. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2015.
83. Sherwood JE, Fraser S, Citron DM, Wexler H, Blakely G, Jobling K, et al. Multi-drug resistant *Bacteroides fragilis* recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan. *Anaerobe.* 2011 Aug;17(4):152–5.
84. Pumbwe L, Wareham DW, Aduse-Opoku J, Brazier JS, Wexler HM. Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Feb 1;13(2):183–9.
85. Nagy E, Urbán E, Carl Erik Nord on behalf of the ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience: Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Mar;17(3):371–9.



86. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJC, Harrell L, et al. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006–2009. *Anaerobe*. 2011 Aug;17(4):147–51.
87. Rogers MB, Bennett TK, Payne CM, Smith CJ. Insertional activation of *cepA* leads to high-level beta-lactamase expression in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. *J Bacteriol*. 1994 Jul 1;176(14):4376–84.
88. Dubreuil L. Anaérobies à gram négatif. In: *Antibiogramme*. Paris: Éd. Eska; 2012. p. 623–36.
89. Eitel Z, Sóki J, Urbán E, Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe*. 2013 Jun;21:43–9.
90. Odou MF, Singer E, Romond MB, Dubreuil L. Isolation and characterization of a porin-like protein of 45 kilodaltons from *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Sep 15;166(2):347–54.
91. Nagy E. Anaerobic Infections Update on Treatment Considerations. 2010 *Drugs* ; 70 (7): 841-858;
92. Singer E, Calvet L, Mory F, Muller C, Chomarar M, Bézian M-C, et al. Surveillance de la résistance aux antibiotiques des anaérobies stricts à Gram négatif. *Médecine Mal Infect*. 2008 May;38(5):256–63.
93. Behra-Miellet J, Calvet L, Mory F, Muller C, Chomarar M, Bézian M., et al. Antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacilli: lessons from a French multicentric survey. *Anaerobe*. 2003 Jun;9(3):105–11.
94. Jamal W, Shahin M, Rotimi VO. Surveillance and trends of antimicrobial resistance among clinical isolates of anaerobes in Kuwait hospitals from 2002 to 2007. *Anaerobe*. 2010 Feb;16(1):1–5.
95. Parker AC, Smith CJ. Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta-lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 May 1;37(5):1028–36.
96. Smith CJ, Tribble GD, Bayley DP. Genetic Elements of *Bacteroides* Species: A Moving Story. *Plasmid*. 1998 Jul;40(1):12–29.
97. Cuchural GJ, Malamy MH, Tally FP. Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986 Nov;30(5):645–8.
98. Bando K, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato N, Ueno K. Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1992 Apr;45(4):542–7.
99. Sóki J, Fodor E, Hecht DW, Edwards R, Rotimi VO, Kerekes I, et al. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J Med Microbiol*. 2004 May 1;53(5):413–9.

100. Podglajen I, Breuil J, Casin I, Collatz E. Genotypic identification of two groups within the species *Bacteroides fragilis* by ribotyping and by analysis of PCR-generated fragment patterns and insertion sequence content. *J Bacteriol.* 1995 Sep;177(18):5270–5.
101. Seifert H, Dalhoff A. German multicentre survey of the antibiotic susceptibility of *Bacteroides fragilis* group and *Prevotella* species isolated from intra-abdominal infections: results from the PRISMA study. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Nov 1;65(11):2405–10.
102. Lee Y, Park Y, Kim MS, Yong D, Jeong SH, Lee K, et al. Antimicrobial Susceptibility Patterns for Recent Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep 1;54(9):3993–7.
103. Liu C-Y, Huang Y-T, Liao C-H, Yen L-C, Lin H-Y, Hsueh P-R. Increasing Trends in Antimicrobial Resistance among Clinically Important Anaerobes and *Bacteroides fragilis* Isolates Causing Nosocomial Infections: Emerging Resistance to Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sep 1;52(9):3161–8.
104. Fernández-Canigia L, Litterio M, Legaria MC, Castello L, Predari SC, Martino AD, et al. First National Survey of Antibiotic Susceptibility of the *Bacteroides fragilis* Group: Emerging Resistance to Carbapenems in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar 1;56(3):1309–14.
105. Karlowsky JA, Walkty AJ, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, Zhanel GG. Prevalence of Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* Group in Canada in 2010-2011: CANWARD Surveillance Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar 1;56(3):1247–52.
106. Diniz CG, Farias LM, Carvalho MAR, Rocha ER, Smith CJ. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul 1;54(1):100–8.
107. Roberts MC. Acquired tetracycline and/or macrolide–lincosamides–streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe.* 2003 Apr;9(2):63–9.
108. Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. Comparative In Vitro Susceptibilities of 396 Unusual Anaerobic Strains to Tigecycline and Eight Other Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Oct 1;50(10):3507–13.
109. Hedberg M, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Jun 1;9(6):475–88.
110. Golan Y, McDermott LA, Jacobus NV, Goldstein EJC, Finegold S, Harrell LJ, et al. Emergence of fluoroquinolone resistance among *Bacteroides* species. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Aug 1;52(2):208–13.
111. Oh H, Edlund C. Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Jun 1;9(6):512–7.
112. Dubreuil L, Behra-Miellet J, Vouillot C, Bland S, Sedallian A, Mory F.  $\beta$ -lactamase production in *Prevotella* and in vitro susceptibilities to selected  $\beta$ -lactam antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 Mar;21(3):267–73.

113. Sandoe J a. T, Struthers JK, Brazier JS. Subdural empyema caused by *Prevotella loescheii* with reduced susceptibility to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Mar 1;47(3):366–7.
114. Mory F, Carlier J-P, Alauzet C, Thouvenin M, Schuhmacher H, Lozniewski A. Bacteremia Caused by a Metronidazole-Resistant *Prevotella* sp. Strain. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5380–3.
115. Tunér K, Lindqvist L, Nord CE. Purification and properties of a novel beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Jun;27(6):943–7.
116. Nyfors S, Könönen E, Syrjänen R, Komulainen E, Jousimies-Somer H. Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jan 1;51(1):107–12.
117. Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, Goldstein EJC, Rodloff AC, Claros M, et al. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jun 1;53(6):1039–44.
118. Brazier J, Chmelar D, Dubreuil L, Feierl G, Hedberg M, Kalenic S, et al. European surveillance study on antimicrobial susceptibility of Gram-positive anaerobic cocci. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Apr;31(4):316–20.
119. Dubreuil L. Anaérobies à gram positif. In: *Antibiogramme*. Paris: Éd. Eska; 2012. p. 623–36.
120. Theron MM, van Rensburg MNJ, Chalkley LJ. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic Gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.). *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul 1;54(1):240–2.
121. Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Dec;34(6):516–22.
122. Farrow KA, Lyras D, Rood JI. Genomic analysis of the erythromycin resistance element Tn5398 from *Clostridium difficile*. *Microbiol Read Engl.* 2001 Oct;147(Pt 10):2717–28.
123. Terhes G, Urbán E, Sóki J, Szikra L, Konkoly-Thege M, Vollain M, et al. Assessment of changes in the epidemiology of *Clostridium difficile* isolated from diarrheal patients in Hungary. *Anaerobe.* 2009 Dec;15(6):237–40.
124. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, Brazier JS, Barbut F, Delmée M, et al. Fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile* isolates from a prospective study of *C. difficile* infections in Europe. *J Med Microbiol.* 2008 Jun;57(Pt 6):784–9.
125. Brazier JS, Fawley W, Freeman J, Wilcox MH. Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Nov 1;48(5):741–2.
126. Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Créixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* Susceptibility to Metronidazole and Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun;46(6):1647–50.

127. Peláez T, Cercenado E, Alcalá L, Marín M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, et al. Metronidazole Resistance in *Clostridium difficile* Is Heterogeneous. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):3028–32.
128. Eitel Z, Terhes G, Sóki J, Nagy E, Urbán E. Investigation of the MICs of fidaxomicin and other antibiotics against Hungarian *Clostridium difficile* isolates. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:47–9.
129. Norén T, Alriksson I, Akerlund T, Burman LG, Unemo M. In vitro susceptibility to 17 antimicrobials of clinical *Clostridium difficile* isolates collected in 1993-2007 in Sweden. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Aug;16(8):1104–10.
130. Lubbe MM, Stanley K, Chalkley LJ. Prevalence of *nim* genes in anaerobic/facultative anaerobic bacteria isolated in South Africa. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Mar 1;172(1):79–83.
131. Oprica C, Nord CE. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Mar 1;11(3):204–13.
132. Ross J i., Snelling A m., Carnegie E, Coates P, Cunliffe W j., Bettoli V, et al. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol*. 2003 Mar 1;148(3):467–78.
133. Hansen J., Fjeldsøe-Nielsen H, Sulim S, Kemp M, Christensen J. *Actinomyces* species: A Danish Survey on Human Infections and Microbiological Characteristics. *Open Microbiol J*. 2009 Jul 23;3:113–20.
134. Kornowski R, Schwartz D, Averbuch M, Levo Y, Giladi M, Berger S. Anaerobic bacteremia: A retrospective four-year analysis in general medicine and cancer patients. *Infection*. 1993 Jul 1;21(4):241–4.
135. Edmiston, Jr. CE, Krepel CJ, Seabrook GR, Jochimsen WG. Anaerobic Infections in the Surgical Patient: Microbial Etiology and Therapy. *Clin Infect Dis*. 2002 Sep;35(s1):S112–8.
136. Israil AM, Delcaru C, Palade RS, Chifiriuc C, Iordache C, Vasile D, et al. Bacteriological aspects implicated in abdominal surgical emergencies. *Chir Buchar Rom* 1990. 2010 Dec;105(6):779–87.
137. Bengualid V, Singh H, Singh V, Berger J. An Increase in the Incidence of Anaerobic Bacteremia: True for Tertiary Care Referral Centers but Not for Community Hospitals? *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 15;46(2):323–323.
138. Montravers P, Dufour G, Daoud O, Balcan I. Péritonites. *EMC - Anesth-Réanimation*. 2013 Apr;10(2):1–16.
139. Edmiston CE, Walker AP. Microbiology of intraabdominal infections. *Inf Clin Pr*. 1996 Suppl. 1):15–9;

140. Oussalah A et al. Diagnostic accuracy of procalcitonin for predicting blood culture results in patients with suspected bloodstream infection: observational study on 44,951 consecutive patients. Article accepté à publier dans *Medecine*.
141. Dawson S. Blood culture contaminants. *J Hosp Infect*. 2014 May;87(1):1–10.
142. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:4–10.
143. Hecht DW. Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe*. 2006 Jun;12(3):115–21.
144. Haggoud A, Reysset G, Azeddoug H, Sebald M. Nucleotide sequence analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and of a new insertion sequence upstream of the two genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 May;38(5):1047–51.
145. Shilnikova II, Dmitrieva NV. Evaluation of antibiotic susceptibility of *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species isolated from patients of the N. N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:15–8.
146. Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, Dimitrova L, Mitov I. Trends in antibiotic resistance in *Prevotella* species from patients of the University Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria, in 2003–2009. *Anaerobe*. 2010 Oct;16(5):489–92.
147. Veloo ACM, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility profiles of anaerobic pathogens in The Netherlands. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:19–24.
148. Ank N, Sydenham TV, Iversen LH, Justesen US, Wang M. Characterisation of a multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* isolate recovered from blood of a patient in Denmark using whole-genome sequencing. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jul;46(1):117–20.
149. Novak A, Rubic Z, Dogas V, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a University Hospital Centre Split, Croatia in 2013. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:31–6.
150. Husain F, Veeranagouda Y, Boente R, Tang K, Mulato G, Wexler HM. The Ellis Island Effect. *Mob Genet Elem*. 2014 Jul 14;4.



## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 21 octobre 2015

### DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : REGNAULT Loïc

Vu,  
Nancy, le 21/09/2015

Sujet : Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies isolées d'hémocultures au CHU de Nancy en 2010 et en 2014

#### Jury :

Président : M. Christophe GANTZER, Professeur  
Directeur : M. Alain LOZNIIEWSKI, Professeur  
Juges : Mme Janina FERRAND, Assistante hospitalo-universitaire  
Mme Christelle FABBRO, Praticienne hospitalière

Le Président du Jury      Directeur de Thèse

  
M. C. Gantzer

  
M. A. LOZNIIEWSKI

Vu et approuvé,

Nancy, le

Vu,

Nancy, le 5-10-2015

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

  
Franckne PAULUS



Le Président de l'Université de Lorraine,

Pour le Président et par délégation  
Le Vice-Président

  
Martia BELGACW  
Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 8057





N° d'identification: 8057

**TITRE**

**Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies isolées  
d'hémocultures au CHU de Nancy en 2010 et en 2014**

**Thèse soutenue le 21 octobre 2015  
Par REGNAULT Loïc**

**RESUME :**

Les bactéries anaérobies sont responsables de nombreuses infections dont certaines, comme les bactériémies, sont très sévères. Au sein de ce groupe bactérien, l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques utilisés pour le traitement de ces infections peut conduire à des échecs thérapeutiques. Ceci souligne l'importance d'étudier la sensibilité aux antibiotiques de ces bactéries, de culture parfois fastidieuse, notamment en cas d'infections sévères.

Dans ce travail nous avons comparé, par une analyse rétrospective des dossiers informatiques de laboratoire, l'évolution de la résistance aux antibiotiques des bactéries anaérobies responsables de bactériémies chez des patients hospitalisés en 2010 et en 2014 au CHRU de Nancy. Parmi les *Prevotella* spp., une augmentation de la résistance à l'amoxicilline (62,5% de souches sensibles en 2010 versus 25% en 2014) et à la moxifloxacine (93,8% de souches sensibles en 2010 versus 50% en 2014) a été constatée. Aucune autre évolution significative du niveau de résistance aux antibiotiques n'a été observée. Plus de 90% des isolats étaient sensibles à la pipéracilline-tazobactam et plus de 95% étaient sensibles à l'imipénème et au métronidazole. Parmi les *Bacteroides* du groupe fragilis, un taux relativement élevé de la résistance à l'amoxicilline- acide clavulanique (15%) a été observé.

Ces résultats montrent la nécessité d'une surveillance régulière de la sensibilité des isolats anaérobies pour adapter les protocoles locaux d'antibiothérapie empirique des bactériémies liées à ce groupe bactérien.

**MOTS CLES :** bactéries anaérobies, antibiogramme, bactériémie, antibiotique

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<u>Alain LOZNIEMSKI</u>	Laboratoire de Bactériologie CHU NANCY	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
⑤- Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle