



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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

NANCY UNIVERSITE
2008

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
Du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
De BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 17 juin 2008

Par Marion GRARE

Née le 18 août 1980

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

THESE
Pour le DIPLOME D'ETAT
De DOCTEUR en PHARMACIE

Des ERG et des Hommes...
Et le Bactériologiste dans tout ça ?

Membres du Jury

Président : Mme Chantal FINANCE, Professeur et Doyen, Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : M. Alain LOZNIIEWSKI, PU-PH, Faculté de Médecine, Nancy (directeur de thèse)
Mme Janine SCHWARTZBROD, Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy
M. Christian RABAUD, PU-PH, Faculté de Médecine, Nancy
Mme Nejla AISSA, Praticien hospitalier, Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales

Janine SCHWARTZBROD

Responsable de la Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la Commission Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH :

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire

Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité)	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON	Pharmacologie
Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU	Biochimie clinique
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON	Hématologie, Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et Santé
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA	Physiologie
Gérald CATAU	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Bernard DANGIEN	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique

François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL.....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE.....	Hématologie
Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND.....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Patrick MENU.....	Physiologie
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER.....	Sémiologie
-------------------------	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD.....	Anglais
-------------------------	---------

ASSISTANT

Annie PAVIS.....	Bactériologie
------------------	---------------

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITÉ (SCD)

Anne-Pascale PARRET.....	Directeur
Frédérique FERON.....	Responsable de la section Pharmacie- Odontologie

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 ».

Ce n'est pas parce les choses sont compliquées que nous n'osons pas,

C'est parce que nous n'osons pas que les choses sont compliquées.

Sénèque

Parler ne fait pas cuire le riz.

Proverbe chinois.

Remerciements

Aux membres du jury

Je tiens à vous témoigner ma gratitude et mes plus sincères remerciements, vous me faites un immense honneur en acceptant de participer à l'évaluation de ce mémoire de DES de Biologie Médicale.

A M^{me} Chantal FINANCE, Professeur et Doyen, Faculté de Pharmacie, Nancy

Je vous prie d'accepter toute ma reconnaissance, pour me faire l'honneur de présider ce jury, et pour avoir contribué à mon épanouissement dans le domaine de la Microbiologie et de la Recherche.

A M. Alain LOZNIEWSKI, PU-PH, Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

Recevez mes sincères remerciements, pour avoir dirigé cette thèse avec confiance et intérêt, pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, et pour vos encouragements.

A M^{me} Janine SCHWARTZBROD, Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy

Je vous remercie chaleureusement pour avoir accepté de juger ce travail, et pour avoir, lors de mon parcours d'étudiante en Pharmacie, su éveiller une vocation.

A M. Christian RABAUD, PU-PH, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, CHUN, Nancy

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude, pour votre présence dans ce jury, mais aussi et surtout pour avoir su me communiquer avec enthousiasme votre expérience clinique et thérapeutique.

A M^{me} Nejla AISSA, PH, Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

Que te dire... à part un grand MERCI : pour ta présence, ton sourire, ta passion pour la Bactériologie que tu as su me transmettre. C'est avec grand plaisir que je te vois siéger dans mon jury aujourd'hui.

A tous ceux qui ont participé à mes découvertes en Bactériologie...

A Michèle DAILLOUX, MCU-PH, Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

Ces mots ne seront rien, comparés à tout ce que je vous dois. Merci pour votre enthousiasme, votre pédagogie, votre rigueur, vos encouragements. J'ai parcouru à vos côtés un petit bout de chemin dans le monde des Mycobactéries. Merci de m'y avoir fait une petite place et de m'avoir toujours poussée à aller de l'avant. Vous êtes une femme exceptionnelle, merci aussi pour cette leçon d'humilité et de courage.

A Catherine LAURAIN, PA, Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

Merci pour tout : ta présence, tes conseils, ton soutien, le partage de ton expérience... Merci pour ton sourire, pour nos fous rires, pour nos « petites manips » qui n'ont pas toujours fonctionné comme nous l'aurions voulu (un souvenir de *Mycobacterium fortuitum* par exemple !)...INF γ et H₂O₂ n'ont plus de secret pour nous !

A Marie-Christine CONROY, PH, Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

Vous avez accompagné mes premiers pas en Bactériologie clinique... des odeurs, des couleurs, des aspects... Merci d'avoir éveillé une vocation !

A Christine LION, Francine MORY, Tahar HADOU, Corentine ALAUZET, Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

Vous avez tous participé à mes découvertes et à ma formation. Soyez en remerciés !

A toutes les techniciennes du Laboratoire de Bactériologie, CHUN, Nancy

Apprendre à vos côtés a été un réel plaisir, merci.

A tous ceux qui ont jalonné mon chemin...

A mes parents,

Sans vous, je ne serais pas là aujourd'hui. Merci d'avoir toujours été là à mes côtés, merci de vos encouragements, merci pour votre patience... et oui, le parcours a été long, mais je vous rassure, enfin c'est terminé (presque... ?) !

A ma sœur, Hélène,

Apprendre, comprendre, se battre, rester debout malgré les obstacles, les déceptions... Tu as toujours été là pour m'aider à me relever, et pour m'encourager à poursuivre dans cette voie... Merci d'être là et merci d'être toi...

A toute ma famille : Mimy, Pascal, Sara, Mamie, Isabelle, Fabien... et à ceux qui ne sont plus mais qui comptent encore énormément,

Merci tout simplement... La fierté dans vos yeux est le plus beau des cadeaux.

A Marianne, ma complice de toujours,

On partage tout, les mêmes fous rires, les mêmes combats... Quand l'une baisse les bras, l'autre est toujours là... Chapeau pour ta force face à l'adversité, pour ta persévérance, pour ta curiosité, pour ta capacité d'autodérision, pour ton dévouement, et ton dynamisme... Quand je te regarde, je me rends compte du long chemin qu'il me reste encore à parcourir...

A Raphaël,

Il était une fois mon alter-ego... La suite, tu la devineras aisément... Merci...

A Géraldine, Magali, Céline, Anne-Lise, Aurore, Lorène, Isa, Marie, Aurélie, Anne, Patricia, Maryse, Stéphane, Anne-Charlotte,

Mes amis d'enfance, de fac, d'internat, de labo... Merci pour tout...

... et merci à tous les sapins de Noël, variété Nordmann...

Sommaire

TABLE DES FIGURES et DES TABLEAUX	1
ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	10
1 ^{ère} PARTIE : UN POINT BIBLIOGRAPHIQUE	13
Chapitre I. Glycopeptides et résistance des entérocoques	14
1.1. Rappels sur la synthèse du peptidoglycane	14
1.2. Les glycopeptides et les nouveaux dérivés	18
1.3. Les entérocoques : particularités	25
1.4. Entérocoques versus Glycopeptides	28
1.5. Gestion des épidémies à ERG	54
Chapitre II. Rôle du laboratoire de Bactériologie dans la détection des résistances bactériennes	67
2.1. Détermination de la sensibilité <i>in vitro</i> : l'antibiogramme	67
2.2. Lecture interprétative de l'antibiogramme	73
2.3. Mise en évidence d'une résistance hétérogène	76
2.4. Identification et mise en évidence de gènes de résistance : exemple des gènes <i>van</i> par PCR multiplex	78
2.5. Typage des souches : épidémiologie, suivi d'un clone	85
Chapitre III. Rôle du laboratoire de Bactériologie dans la surveillance et le signalement des infections nosocomiales	89
3.1. Quelques définitions	89
3.2. Programme national de lutte contre les IN : place du laboratoire de Bactériologie	91

2^{ème} PARTIE : UN POINT EPIDEMIOLOGIQUE, Gestion d'une épidémie à *Enterococcus faecium vanA* au CHU de Nancy et dans la région Lorraine 100

Chapitre I. 2004-2005 : une épidémie à ERG qui naît et qui grandit	102
1.1. Décembre 2004 : 1 ^{ère} vague de l'épidémie	102
1.2. Janvier-Mai 2005 : 2 ^{ème} vague de l'épidémie	105
1.3. Mai-Juin 2005 : flambée et point épidémiologique en liaison avec l'InVS	109
Chapitre II. Eté 2005-Eté 2006 : une accalmie ?	113
2.1. Evolution vers une fin de l'épidémie ?	113
2.2. Analyse rétrospective : mesures mises en œuvre et analyse de leur impact	117
Chapitre III. Fin 2006-Fin 2007 : Réveil des ERG et nouvelle épidémie	119
3.1. Suivre épidémiologique	119
3.2. Evaluation des pratiques en Hygiène, enquête réalisée par la CRH et l'EOHH	128
3.3. Conclusions sur l'évolution de cette 2 ^{ème} épidémie	130

3^{ème} PARTIE : Sélection d'un milieu sélectif chromogène dans un contexte épidémique 141

Chapitre I. Rôle du laboratoire de Bactériologie du CHUN : les différentes étapes de l'organisation du dépistage	143
1.1. Phase 1 : Gélose BBL Enterococcosel (BD) jusqu'au 28/01/07	146
1.2. Phase 2 : Changement du milieu → milieu chromogène VRE (AES Chemunex) : du 29/01/07 au 27/02/07	147
1.3. Phase 3 : Ajout d'une étape → passage par un bouillon VRE (AES Chemunex) : du 28/02/07 au 23/04/07	151
1.4. Phase 4 (2 bis) : milieu chromogène VRE du 23/04/07 au 10/06/07	156
1.5. Evolution du nombre de PCR réalisées et de leur difficulté d'interprétation lors des différentes phases du dépistage	156

Chapitre II. Généralités sur les milieux chromogènes	162
2.1. Principe	162
2.2. Intérêt des milieux chromogènes par rapport aux milieux classiques	163
Chapitre III. Evaluation de 3 milieux chromogènes sélectifs : VRE (AES Chemunex), chromID VRE (bioMérieux) et chromAgar VRE (chromAgar Laboratoires)	165
3.1. Revue de la littérature	165
3.2. Présentation des milieux étudiés	172
3.3. Données préliminaires sur souches de collection	177
3.4. Evaluation des performances des 3 milieux sur écouvillons rectaux réalisés dans le cadre du dépistage des ERG	180
3.5. Evaluation du milieu chromID VRE en situation épidémique	188
CONCLUSION	200
BIBLIOGRAPHIE	204
ANNEXES	227

Table des figures & tableaux

Figure 1 : Schéma des parois des bactéries A : à Gram -, B : à Gram +.	16
Figure 2 : Principales étapes de la synthèse du peptidoglycane.	17
Figure 3 : Cible d'action des glycopeptides.	21
Figure 4 : Structure du complexe glycopeptide / dipeptide DAla-DAla.	21
Figure 5 : Structure des glycopeptides, et des nouveaux lipoglycopeptides.	24
Figure 6 : Répartition en clones de 855 souches d' <i>E. faecium</i> sur la base des profils alléliques obtenus par MLST ; selon l'algorithme de eBURST.	30
Figure 7 : Proportion de résistance à la vancomycine chez les entérocoques, Etats Unis, 1989-2003.	31
Figure 8 : <i>Enterococcus faecium</i> : fréquence de la résistance à la vancomycine (A) et de la résistance de haut niveau aux aminosides (B) en Europe en 2005.	32
Figure 9 : Nombre de signalements d'isolement d'ERG en France, entre 2001 et 2006 (données InVS au 11/01/2007).	33
Figure 10 : Répartition des différents clones d'ERG, en France, 2005-2006.	34
Figure 11 : Interaction entre la vancomycine et les précurseurs du peptidoglycane.	36
Figure 12 : Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentadepsipeptidiques chez une souche d' <i>Enterococcus faecium vanA</i> . Niveaux d'action de VanA et VanH.	38
Figure 13 : Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentapeptidiques normaux chez une souche d' <i>Enterococcus faecium vanA</i> . Niveaux d'action de VanX et VanY.	39
Figure 14 : Résistances de type VanC, VanA, VanB et VanD..	40
Figure 15 : Système de régulation à deux composantes VanR/S.	42
Figure 16 : Régulation positive et négative de la phosphorylation de l'activateur de transcription VanR, par le récepteur VanS.	43
Figure 17 : Images obtenues par microscopie électronique de la souche Mu50 (variation de l'épaisseur de la paroi en fonction de la composition du milieu).	52

Figure 18 : Valeurs de CMI ₉₀ obtenues pour les différents antibiotiques testés, pour les isolats cliniques de <i>E. faecium vanA</i> isolés en Corée en 1998 et 2005.	61
Figure 19 : (A) Exemples de listes standard et complémentaire. (B) Recommandations concernant vancomycine et teicoplanine chez les <i>Enterococcus</i> spp. [CA-SFM, 2008].	75
Figure 20 : (A) Phénotype homogène. (B) Phénotype hétérogène, avec croissance de quelques colonies dans la zone elliptique d'inhibition d'une bandelette E-test vancomycine.	77
Figure 21 : Analyse par PCR multiplex de différentes souches d'entérocoques sensibles ou résistants aux glycopeptides.	80
Figure 22 : Comparaison des résultats obtenus par PCR multiplex, après (A) une seule purification, (B) une double purification.	82
Figure 23 : Exemple d'analyse de répartition des ERG hospitaliers dans divers clusters (58 souches, 31 hôpitaux allemands), basés sur la macro-restriction par SmaI, par technique PFGE.	87
Figure 24 : Place du laboratoire de Bactériologie dans le système de lutte contre les IN.	93
Figure 25 : Circuit de signalement des infections nosocomiales.	97
Figure 26 : Lien temporel et spatial entre les patients dépistés porteur d'ERV. Les chiffres figurés sous la mention « Néphrologie » sont les numéros de chambres où ont séjourné les patients.	104
Figure 27 : Situation épidémiologique en dehors du CHUN.	108
Figure 28 : Evolution de l'épidémie entre septembre 2004 et mai 2005, en nombre total de cas dépistés/mois.	111
Figure 29 : Evolution chronologique des ERV (en séparant les colonisations ou infections des dépistages).	112
Figure 30 : Courbe épidémique (infections, colonisations et portages) au 22/12/2006.	121
Figure 31 : Evolution de l'incidence en Lorraine, entre octobre 2004 et octobre 2007. ERP : Enquête régionale de prévalence.	131

Figure 32 : Répartition des cas dépistés ERG+ dans et en dehors du CHUN.	132
Figure 33 : Evolution de l'incidence des ERG en Lorraine, hors CHUN.	133
Figure 34 : Répartition des cas dépistés ERG+ au sein des différents services du CHUN. Bilan au 3 août 2007 – Cas dépistés depuis le 1 ^{er} août 2006.	135
Figure 35 : Histogramme d'évolution du nombre de patients dépistés ERG+ depuis septembre 2005 (d'après le rapport hebdomadaire de l'EOHH, daté du 01 novembre 2007).	136
Figure 36 : Evolution du nombre de patients porteurs dépistés dans différents services du CHUN, depuis septembre 2005 : Néphrologie/Dialyse, HGE, Gériatrie (Médecine B).	137
Figure 37 : Bilan de l'évolution de l'épidémie depuis fin 2004. Nombre de cas dépistés ERG+, principaux services touchés et évènements à signaler.	140
Figure 38 : Répartition des <i>E. faecium vanA</i> détectés en fonction du type de prélèvement, colonisation (visée épidémiologique) ou infection (visée diagnostique), en 2005, 2006 et 2007.	144
Figure 39 : Pourcentage, parmi l'ensemble des entérocoques isolés, de <i>E. faecium</i> et de <i>E. faecium</i> résistants aux glycopeptides (EFRG) isolés de sites potentiellement infectés.	144
Figure 40 : Nombre d'isolats d'ERG répertoriés par type de prélèvement diagnostique.	145
Figure 41 : Procédure d'ensemencement des écouvillons rectaux sur gélose VRE (AES). Site de Brabois.	148
Figure 42 : Protocole d'ensemencement des écouvillons rectaux sur gélose VRE (AES). Site de Central.	149
Figure 43 : Protocole d'identification de l'espèce et du phénotype de résistance par PCR Multiplex. Procédure à suivre en fonction du résultat de la PCR : positive, négative ou douteuse.	150
Figure 44 : Délai de réponse définitive lors des deux premières phases du dépistage des ERG dans les écouvillons rectaux. Phase 1 : Gélose Entéroccoccosel ; Phase 2 : Milieu chromogène VRE (AES).	151
Figure 45 : Protocole technique, et interprétation des résultats durant la PHASE 3.	153

<u>Figure 46</u> : Taux de détection, sans (Phase 2) ou avec enrichissement (Phase 3).	154
<u>Figure 47</u> : Délai de rendu des résultats lors des trois premières phases du dépistage des ERG sur écouvillons rectaux. (A) : réponse provisoire par alerte téléphonique ; (B) : réponse définitive.	154
<u>Figure 48</u> : Evolution du nombre d'écouvillons rectaux testés, comparaison avec le nombre de PCR réalisées pour confirmation.	157
<u>Figure 49</u> : % du nombre de PCR réalisées, en fonction du nombre d'écouvillons rectaux testés.	158
<u>Figure 50</u> : Résultats de la PCR. P1 : notre échantillon. P2 : <i>E. faecalis</i> .	160
<u>Figure 51</u> : Résultats de la PCR. P3 : notre échantillon. P4 : PCR négative.	160
<u>Figure 52</u> : Résultats de la PCR. P5 : notre échantillon. P6 : <i>E. faecalis</i> .	161
<u>Figure 53</u> : Principe de fonctionnement des substrats chromogéniques.	162
<u>Figure 54</u> : Relation entre la probabilité de détecter un ERG par écouvillonnage rectal, et la quantité d'ERG retrouvée dans les selles (en CFU/g selles).	168
<u>Figure 55</u> : Schéma proposé par Sahm et al., à partir d'un ensemencement sur milieu bile-esculine-azide, avec une caractérisation soit phénotypique, soit génotypique.	170
<u>Figure 56</u> : Répartition des faux positifs à 24 h et à 48 h pour chacun des milieux.	183
<u>Figure 57</u> : Identification des bactéries donnant des colonies violettes sur chromID VRE. (A) à 24 h (n = 16); (B) à 48 h (n = 122).	191
<u>Figure 58</u> : Identification des bactéries donnant des colonies bleu-vert sur chromID VRE, à 48 h.	192
<u>Figure 59</u> : Couleur des colonies pour les échantillons négatifs.	193
<u>Figure 60</u> : Nombre de PCR négatives (non ERG) et positives (ERG) réalisées après culture sur milieu chromID VRE, à partir de colonies suspectes (n = 270). Etude juin-août 2007.	197

<u>Tableau I</u> : Comparaison des activités antibactériennes (CMI) des lipoglycopeptides synthétiques avec la vancomycine.	23
<u>Tableau II</u> : Caractéristiques des résistances aux glycopeptides chez les entérocoques.	48
<u>Tableau III</u> : Séquence des 1 ^{ères} amorces décrites pour la recherche des gènes de résistance aux glycopeptides et des gènes de ligase de <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i> .	79
<u>Tableau IV</u> : Antibiogramme, recherche du gène <i>vanA</i> par PCR et pulsotypage des différentes souches d'ERG isolées en décembre 2004.	105
<u>Tableau V</u> : Adéquations mesures recommandées et mesures mises en place dans le service de Néphrologie dans les 1 ^{ers} mois de l'épidémie.	109
<u>Tableau VI</u> : Avantages et inconvénients des deux types de prélèvements envisageables pour le dépistage du portage intestinal d'ERG.	160
<u>Tableau VII</u> : Principales caractéristiques des différents milieux chromogènes commerciaux utilisés pour la détection des ERG.	176
<u>Tableau VIII</u> : Aspect des colonies et dénombrement après 24 et 48 h d'incubation, des souches de collection, sur les 3 milieux testés.	179
<u>Tableau IX</u> : Performances des différents milieux chromogènes testés, sans coloration de Gram.	183
<u>Tableau X</u> : Performances des différents milieux chromogènes testés, avec de coloration de Gram.	186
<u>Tableau XI</u> : Performances comparées, en l'absence de coloration de Gram.	195
<u>Tableau XII</u> : Performances comparées, avec de coloration de Gram.	195

Abréviations

AFSSA	Agence Française de la Sécurité Sanitaire et des Aliments
APHP	Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
ARH	Agence Régionale de l'Hospitalisation
ATCC	“American Type Culture Collection”
BGN	Bacilles à Gram négatif
BGP	Bacilles à Gram positif
BHI	“Brain Heart Infusion”
BLSE	Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
BMBH	Laboratoire commun de Biologie Moléculaire, de Bactériologie et d'Hygiène
BMR	Bactéries Multi-Résistantes
C ₁ G, C ₂ G, C ₃ G	Céphalosporines de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} ou 3 ^{ème} générations
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CCLIN	Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales
CEA	Cellule Enquête et Action
CGP	cocci à Gram positif
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CHUN	Centre Hospitalier Universitaire de Nancy
CIP	Collection Institut Pasteur
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CRH	Cellule Régionale d'Hygiène
CTINILS	Comité Technique des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux Soins
DDASS	Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DGS	Direction Générale de la Santé
DHOS	Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins
DRASS	Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales
EARSS	“European Antimicrobial Resistance Surveillance System”
Eau BM	eau pour Biologie Moléculaire
ECBU	Examen Cytobactériologique des Urines
EOHH	Equipe Opérationnelle d'Hygiène Hospitalière
EFRG	<i>E. faecium</i> résistants aux glycopeptides
ER	Ecouvillon Rectal

ERG	Entérocoques Résistants aux Glycopeptides
ERV	Entérocoques Résistants à la Vancomycine
GISA	“Glycopeptide-Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i> “
GlcNAc	β -N-acétylglucosamine
GS	Gélose au Sang
GS + V ou GSV	Gélose au Sang + disque de vancomycine
HGE	Service d’Hépto-Gastro-Entérologie
IAS	Infections Associées aux Soins
IN	Infections Nosocomiales
InVS	Institut national de Veille Sanitaire
MH	Mueller Hinton
MLST	“MultiLocus Sequence Typing“
MLVA	“Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis“
Mur-Nac	acide N-acétylmuramique
NHSN	“National Healthcare Safety Network“
PAL	Phosphatase Alcaline
PCR	“Polymerase Chain Reaction“
PCR-TR	PCR en Temps Réel
PLP	Protéines Liant les Pénicillines
PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis“
PSDP	Pneumocoque de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline
PYR	pyrrolidonyl arylamidase
RAISIN	Réseau d’Alerte, d’Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SCN	Staphylocoques à Coagulase Négative
SHA	Solutions Hydro-Alcooliques
ST	Sequence Type
UDP	Uridine Di-Phosphate
USI	Unité de Soins Intensifs
VISA	“Vancomycin-Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i> “
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
VRSA	« Vancomycin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> »

Introduction

La résistance aux antibactériens a officiellement commencé le jour de la première administration d'une molécule antibiotique, et restera probablement un compagnon de route pour une durée indéterminée (tant que les Hommes et les bactéries « cohabiteront » ?). L'année 2008 marque les 20 ans de la publication du 1^{er} rapport d'isolats cliniques d'ERV (Entérocoques Résistants à la Vancomycine). Depuis ces 1^{ers} cas, les ERV ou ERG (Entérocoques Résistants aux Glycopeptides) ont émergé comme d'importants pathogènes nosocomiaux, stimulant une intense recherche pour élucider à la fois l'épidémiologie, les mécanismes de la résistance et les facteurs de risque responsables de l'apparition et de la dissémination de ces pathogènes, généralement considérés comme peu virulents.

L'histoire a montré que les ERG ont été et restent un problème majeur dans les établissements de soins. D'après le rapport du National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report en 2005, les entérocoques sont actuellement la 2^{ème} cause d'infection urinaire nosocomiale et la 3^{ème} cause d'infections des plaies et des bactériémies, aux Etats Unis. Leur très grande résistance dans l'environnement (résistance à la chaleur et à la dessiccation, survie en conditions acides, alcalines, hypo- ou hypertoniques...) permet une survie prolongée. Associée à cela, la mauvaise compliance aux procédures d'hygiène et de lavage des mains par le personnel soignant, favorise une dissémination rapide des ERG en milieu hospitalier.

Un pathogène résistant, naturellement, aux antibiotiques, responsable d'infections nosocomiales, tel que peuvent être les ERG, qui de plus se transmet facilement de personne à personne et persiste dans l'environnement hospitalier, n'est jamais complètement éradiqué, et sa prévalence risque de croître au cours du temps. Avec l'émergence récente de *Staphylococcus aureus* résistants à haut niveau à la vancomycine (VRSA, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*), porteurs du gène *vanA* et retrouvés en co-colonisation avec des souches d'ERG, il devient indispensable de contrôler la dissémination des ERG. La compréhension de l'épidémiologie et de la transmission de ces pathogènes d'un patient colonisé/infecté à un patient non colonisé est essentielle au ralentissement de la progression des épidémies. Seule une attention de chaque instant dans la détection de nouveaux cas d'ERG, que ce soit une colonisation ou une infection, et une concertation pluridisciplinaire (cliniciens, équipe soignante, biologistes, hygiénistes et pharmaciens) peuvent nous permettre d'espérer maintenir

sous contrôle ce pathogène et ainsi prévenir l'émergence et la dissémination des VRSA à l'échelle planétaire.

L'objet de ce mémoire est d'appréhender une épidémie à ERG du point de vue du bactériologiste. Nous développerons dans une 1^{ère} partie, bibliographique, les connaissances indispensables : nous aborderons ainsi les glycopeptides, les entérocoques et la confrontation de ces deux mondes en terme d'épidémiologie, de mécanismes de résistance, et de facteurs de risque. Nous re-situerons dans un 2^{ème} temps les missions du laboratoire de bactériologie en terme de détection des résistances bactériennes et de méthodes à notre disposition, ainsi que son rôle primordial dans la surveillance et le signalement des infections nosocomiales et des épidémies. Dans une 2^{ème} partie, épidémiologique, nous évoquerons l'épidémie qui s'est déroulée au CHU de Nancy depuis 2004, par vagues successives, et discuterons des mesures mises en place et de leur pertinence. Enfin, dans la 3^{ème} partie, expérimentale, nous nous attarderons sur le rôle du bactériologiste au sein d'une telle crise épidémique, et plus particulièrement sur l'évaluation de différents milieux sélectifs chromogènes pour le dépistage des ERG. Nous ouvrirons enfin la discussion sur les leçons à tirer de cette épidémie, et sur la place primordiale que doit jouer le bactériologiste.

Note au lecteur

Tout au long de votre cheminement dans ce mémoire, j'ai glissé quelques « accroches » pour faciliter votre lecture :

en police violet foncé, entouré de deux lignes horizontales : les points plus particuliers concernant les ERG dans la routine d'un laboratoire.

encadré de violet foncé : un petit résumé du paragraphe ou chapitre que vous venez de finir.

encadré de rouge : la conclusion de l'ensemble de la partie, bibliographique, épidémiologique ou expérimentale.

Bonne Lecture !

1^{ère} Partie

Un point bibliographique.

Chapitre I : Glycopeptides et Résistance des Entérocoques

Les glycopeptides, et leurs deux représentants en thérapeutique humaine, vancomycine et teicoplanine, constituent une famille importante d'antibiotiques pour le traitement des infections sévères causées par les cocci à Gram positif, en particulier staphylocoques et entérocoques. Les *Pediococcus* spp., les *Leuconostoc* spp. et certaines espèces de *Lactobacillus* spp. présentent une résistance naturelle aux glycopeptides. De même qu'*Erysipelothrix rhusiopathiae*, qui est généralement considérée comme résistante naturellement à la vancomycine et sensible à la teicoplanine. Ces différentes espèces peuvent faire partie de la flore intestinale, et devront être prises en compte dans les techniques d'isolement des ERG. Les mécanismes de résistance aux glycopeptides chez les *Enterococcus* spp. sont aujourd'hui bien connus, même si de nombreuses découvertes restent à venir : on dénombre au moins 6 phénotypes qui diffèrent par le niveau de résistance, l'expression inductible ou constitutive, le caractère mobile (transposon, plasmide) ou chromosomique... Après un bref rappel sur la synthèse du peptidoglycane nécessaire à la compréhension de la résistance, ce sont ces différents éléments qui seront détaillés dans ce chapitre, ainsi que l'épidémiologie, les facteurs de risque d'acquisition et l'origine des ERG.

1.1. Rappels sur la synthèse du peptidoglycane

☐ Les différents types de paroi

La paroi constitue une structure rigide (squelette externe) qui maintient la forme de la bactérie et la protège du milieu extérieur, notamment des variations de pression osmotique. Elle contrôle les entrées de nutriments et les sorties de déchets. C'est la cible d'action de nombreux antibiotiques. L'ultrastructure et la composition chimique de la paroi permettent de classer les bactéries en 4 groupes :

- les bactéries sans paroi (Mollicutes...).
- les bactéries ayant une paroi de composition particulière, prenant des colorations particulières (Mycobactéries, Tréponèmes...).

› les bactéries à Gram - (Figure 1A) : leur paroi est plus fine et plus complexe. A l'extérieur de la fine couche de peptidoglycane (2,5 nm), se trouve une **membrane externe**, de structure tri lamellaire classique, phospholipidique. Elle est composée de :

- phospholipides,
- et d'une molécule amphiphile, le **lipopolysaccharide** (LPS). On compte 2 à 3 millions de molécules de LPS par bactérie, il forme 45% de la membrane externe. Il est constitué de 3 parties : une extrémité hydrophobe formée par le **lipide A**, le « **core** » structure polysaccharidique, et la partie polysidique polaire émergeant à l'extérieur de la bactérie (**spécificité antigénique O**). Les molécules de LPS sont reliées entre elles par des ions Mg^{2+} qui assurent la stabilité de l'ensemble.

Des protéines variées sont insérées dans cette membrane ; elles ont pour la plupart des fonctions importantes, comme les **porines** qui assurent le transport à travers la paroi des nutriments et de divers composés, ou les **adhésines** qui assurent la fixation des bactéries sur des supports.

L'espace sous la membrane externe dans lequel se trouve le peptidoglycane, est **l'espace périplasmique** ; dans cet espace, se trouvent, associées à la membrane cytoplasmique, les **PLP ou Protéines Liant les Pénicillines**, enzymes assurant la synthèse du peptidoglycane, et les β -lactamases. Ces bactéries ne prennent pas la coloration de Gram et apparaissent en rose (contre-coloration à la fuchsine).

› les bactéries à Gram + (Figure 1B) : elles possèdent une paroi épaisse (20 à 80 nm), essentiellement constituée de peptidoglycane. Elles prennent la coloration de Gram et apparaissent en violet (coloration au violet de gentiane).

Les bactéries à Gram – et à Gram + représentent environ 90% des bactéries rencontrées en clinique.

La structure de la paroi est un élément très important dans l'étude du mécanisme d'action des antibiotiques : certains agissent au niveau de la synthèse du peptidoglycane, d'autres doivent traverser

la paroi pour atteindre des cibles intracellulaires, la présence de la membrane externe représentant alors un obstacle supplémentaire.

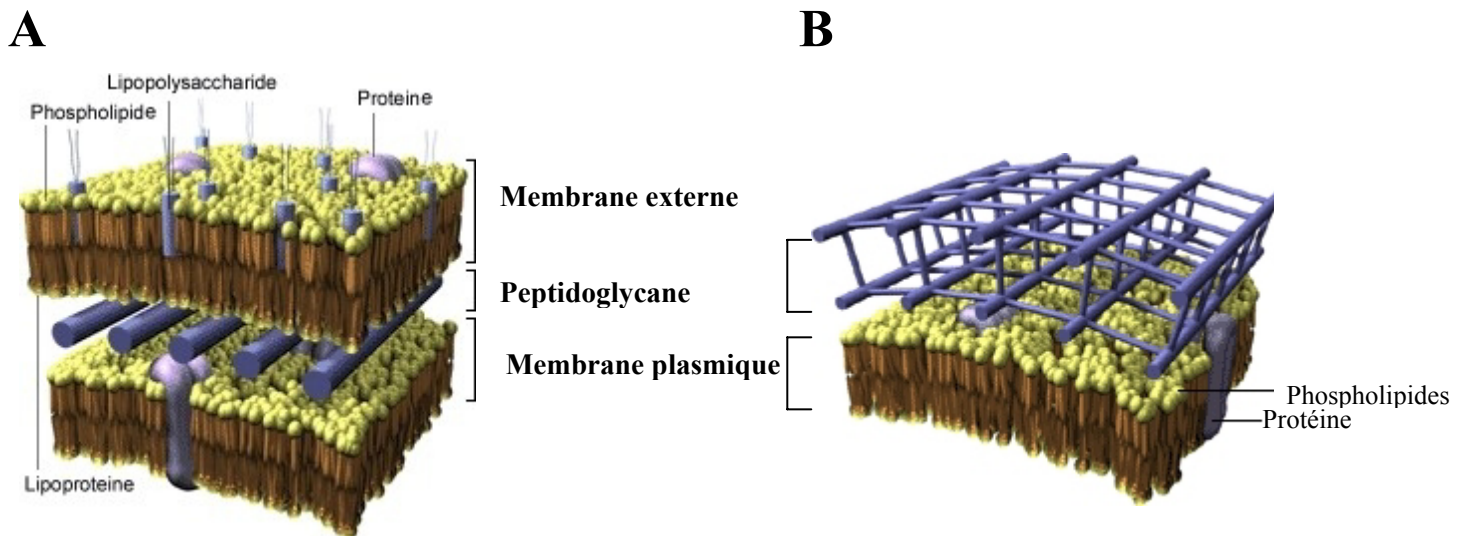


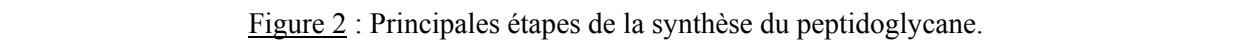
Figure 1 : Schéma des parois des bactéries A : à Gram -, B : à Gram +.

☐ Rappels sur la synthèse du peptidoglycane (Figure 2)

Le peptidoglycane dessine la forme générale de la bactérie, sert de site d'attachement pour des facteurs de virulence ou des adhésines, participe aux modifications morphologiques de la bactérie en réponse à différents facteurs de stress, et son éventuelle fragilité et instabilité entraînent la lyse cellulaire et la mort de la bactérie. C'est une des principales cibles d'action des antibiotiques, en particulier des glycopeptides, c'est pour cela que nous allons en détailler les principales étapes (Figure 2).

Le peptidoglycane est composé de β -N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc), chaînes polysaccharidiques reliées par des liaisons intermoléculaires à des chaînes peptidiques, formant un réseau organisé de couches superposées. La synthèse du peptidoglycane est initiée par 6 enzymes nommées Mur (MurA à MurF), qui catalysent la formation d'uridine diphosphate (UDP)-MurNAc, à partir d'un précurseur UDP-GlcNAc (**MurA et MurB**). Une chaîne de 5 acides aminés est ensuite ajoutée au niveau du groupement D-lactoyl de l'UDP-MurNAc (**MurC à MurF**). Cette séquence peptidique peut varier selon les espèces bactériennes, mais on retrouve

cytoplasme membrane plasmique periplasme



La molécule soluble obtenue, **UDP-MurNAc-pentapeptide**, est associée à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de **MraY**, une protéine hélicoïdale transmembranaire, au niveau d'un groupement undecaprenyl diphosphate. Cette protéine, aujourd'hui appelée **Lipide I**, interagit ensuite avec **MurG**, une N-acétylglucosaminyl transférase, qui ajoute un groupement soluble UDP-GlcNAc. Cette réaction finalise la synthèse du **Lipide II**, le **précurseur disaccharidique du peptidoglycane**, substrat pour les PLP. Le Lipide II est encore dans le compartiment cytoplasmique. A ce niveau intervient une flippase, qui, par un mécanisme inconnu (de type flip-flop ?), permet le transfert au niveau de l'espace périplasmique. Une fois dans cet espace, le **précurseur pentapeptidique** est pris en charge par les PLP : liaison du disaccharide aux chaînes saccharidiques du peptidoglycane néoformé par les **transglycosylases**, coupure du DAla terminal par les **transpeptidases** ou les **D,D carboxypeptidases**, et formation des ponts inter-peptidiques entre le DAla en position 4 / et la L-Lys en position 3, des chaînes adjacentes (Figure 2). Ainsi est obtenu le maillage tridimensionnel parfaitement organisé du peptidoglycane. Le transporteur lipidique est recyclé au niveau cytoplasmique... Tout peut alors recommencer !

1.2. Les glycopeptides et les nouveaux dérivés

1.2.1. Les glycopeptides : mécanisme d'action, spectre et caractéristiques

Le 1^{er} glycopeptide, la vancomycine, a été isolé en 1956 à partir d'échantillons de sols prélevés en Inde et en Indonésie, contenant *Streptomyces orientalis* (aujourd'hui *Nocardia orientalis*). Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique (dont cinq acides aminés sont communs à tous les glycopeptides) sur lequel viennent se greffer des sucres : glucose et vancosamine dans le cas de la vancomycine, mannose et glucosamine dans le cas de la teicoplanine (extraite de *Actinoplanes teicomycetus*).

Deux spécialités sont commercialisées à l'heure actuelle :

‣ **Vancomycine** (VANCOCINE®)

‣ **Teicoplanine** (TARGOCID®) : cette molécule est moins utilisée du fait, essentiellement, de son coût plus important (à noter qu'elle n'est pas commercialisée aux Etats Unis).

D'abord « boudés » pour leur trop grande toxicité, les glycopeptides ont été très utilisés dans les années 1970 suite à l'émergence des *Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline (SARM), en particulier dans les Unités de Soins Intensifs (USI) aux Etats Unis.

- Mécanisme d'action (Figures 3 et 4)

Les glycopeptides sont, au même titre que les β -lactamines, des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, mais dans sa phase finale, au stade pariétal. La poche vient recouvrir le dipeptide DAla-DAla situé à l'extrémité des précurseurs pentapeptidiques du peptidoglycane, théoriquement prêts à être incorporés dans le peptidoglycane en cours d'élongation. Par encombrement stérique, les glycopeptides vont ainsi empêcher l'action des glycosyltransférases et des transpeptidases, bloquant ainsi l'élongation du peptidoglycane. Cela se traduit aussi par une accumulation de précurseurs au niveau cytoplasmique, et par un blocage des transporteurs (en absence de recyclage, impossibilité de transférer de nouveaux pentapeptides au niveau de l'espace périplasmique).

Les glycopeptides sont lentement bactéricides (24-48h) mais les mécanismes à l'origine de la bactéricidie sont inconnus à l'heure actuelle.

- Spectre d'activité : ETROIT

Les glycopeptides sont actifs exclusivement sur les bactéries à Gram + :

‣ *Staphylococcus* spp., y compris les souches résistantes à la méricilline (SARM), *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. La teicoplanine est inconstamment active sur les staphylocoques à coagulase négative (SCN).

‣ *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Clostridium difficile*.

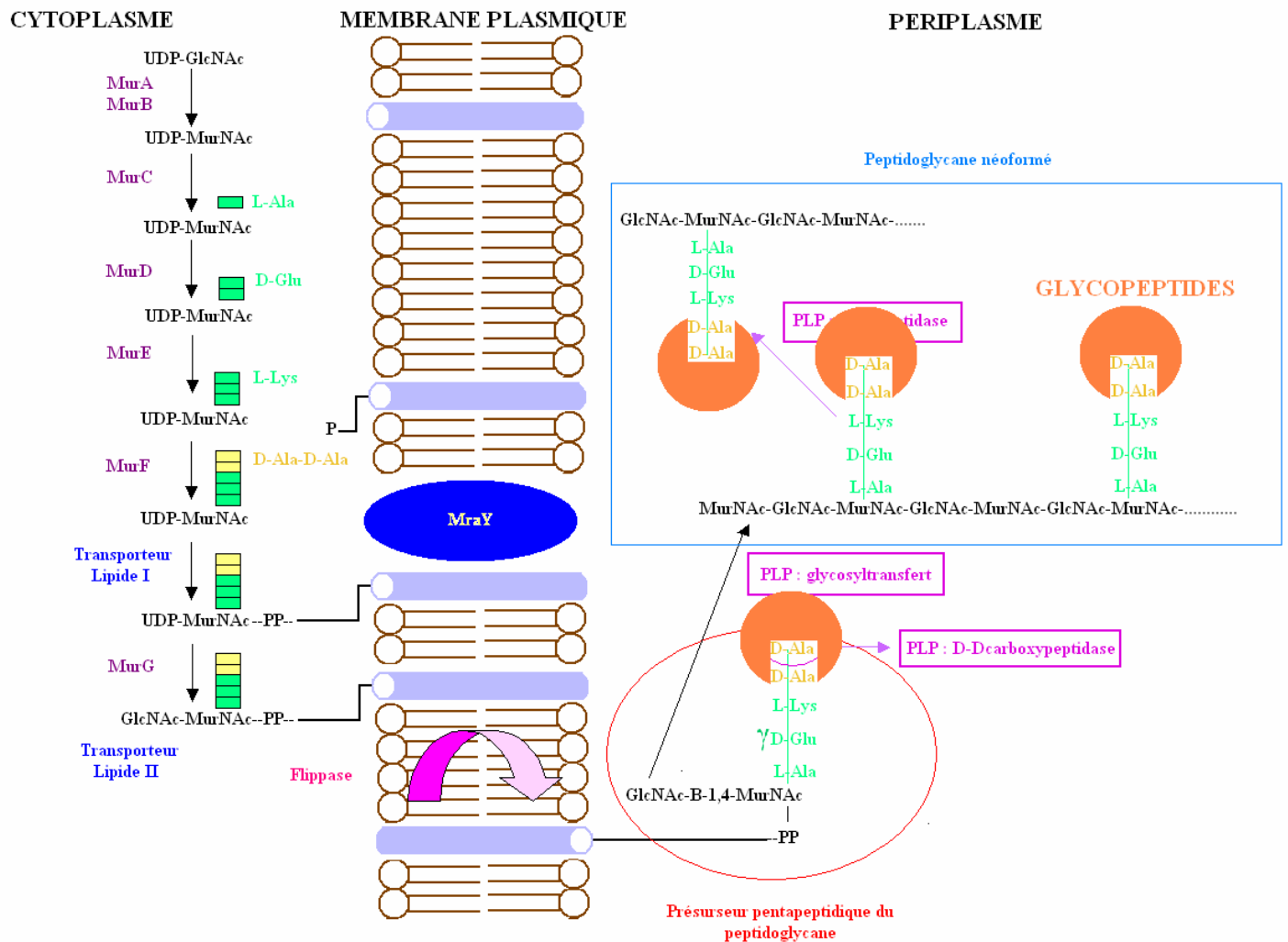


Figure 3 : Cible d'action des glycopeptides.

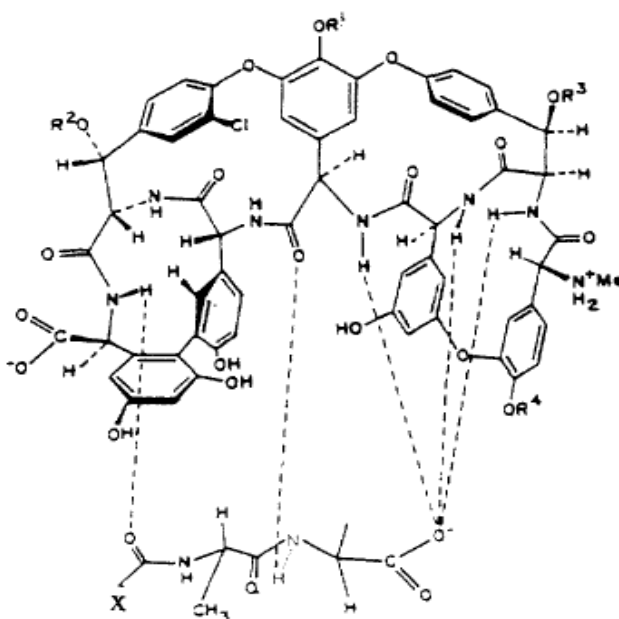


Figure 4 : Structure du complexe glycopeptide / dipeptide DAla-DAla (d'après [Arthur et al., 1996]).

La liaison entre le glycopeptide et l'extrémité Dala-Dala du précurseur du peptidoglycane implique 5 liaisons hydrogène.

Les glycopeptides sont inactifs sur les BGN (leur taille les empêchant de pénétrer par la voie des porines), les anaérobies à Gram -, et les bactéries à multiplication intracellulaire.

- Effets indésirables : OTOTOXICITE et NEPHROTOXICITE

La toxicité est essentiellement rénale et auditive. Elle est rare mais doit être prévenue par une hydratation suffisante, une surveillance rigoureuse chez le sujet âgé ou anémique, une adaptation posologique chez l'insuffisant rénal, et la plus grande prudence en cas d'association à d'autres produits potentiellement néphrotoxiques ou ototoxiques tels que les aminosides.

‣ **ototoxicité à prédominance cochléaire dose-dépendante** : acouphènes, vertiges pouvant conduire à la surdité.

‣ **néphrotoxicité** : leur administration nécessite des dosages sériques répétés ; les concentrations sériques doivent être comprises au pic entre 30 et 45 mg/L pour la vancomycine et 40 à 50 mg/L pour la teicoplanine, le taux résiduel entre 10 et 15 mg/L pour les deux produits (20 à 30 mg/L dans les endocardites et les infections osseuses).

- Bilan biologique

Des éosinophilies et neutropénies rapidement réversibles à l'arrêt du traitement, des augmentations des transaminases et des phosphatases alcalines ont été répertoriées.

- Principales indications

‣ Infections sévères à SARM : bactériémies, endocardites, péritonites, médiastinites, infections ostéo-articulaires, infections sur cathéter ou chambre implantable.

‣ Infections à SASM, *Streptococcus* spp., y compris *S. pneumoniae*, *Enterococcus* spp. chez les patients allergiques aux β -lactamines.

‣ Méningites à *S. pneumoniae* de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline (PSDP) : traitement de 1^{ère} intention en association à une C₃G.

1.2.2. Les nouveaux lipoglycopeptides : oritavancine, dalbavancine, télavancine

Des avancées significatives ont été réalisées dans le domaine des antibiotiques glycopeptidiques, en particulier ces 20 dernières années. Cela est très important si l'on considère le challenge posé par l'apparition et la dissémination de la résistance aux glycopeptides. Les travaux menés sur d'éventuels dérivés semi-synthétiques à partir de la vancomycine et de la teicoplanine ont révélé trois bons candidats potentiels : oritavancine, dalbavancine et télavancine, dont nous allons conter, en quelques mots, l'histoire.

▣ Oritavancine

L'oritavancine (LY 333328), dérivé de la vancomycine, a été le 1^{er} candidat de la nouvelle famille, « les glycopeptides de 2^{ème} génération ou lipoglycopeptides » (structure chimique présentée Figure 5). Le spectre antibactérien, tout comme celui de la vancomycine, est centré sur les cocci à Gram positif, avec cependant une activité étendue aux entérocoques porteurs des gènes *vanA*, aux VRSA, aux staphylocoques et à *S. pneumoniae* (cf. Tableau I). Alors que les glycopeptides ont une activité bactériostatique sur les entérocoques, l'oritavancine est bactéricide, avec une demi-vie prolongée (18 h) [Pace & Yang, 2006]. Diverses études cliniques de phase II et III ont montré une non infériorité de l'oritavancine, par comparaison à l'association vancomycine + cephalexine, tout en permettant une réduction de la durée de traitement [Mercier et al., 2005].

▣ Dalbavancine

Ce dérivé de la teicoplanine est le plus avancé en terme d'études cliniques. Le squelette de la teicoplanine a été modifié par ajout d'un groupement amide au niveau C terminal et par modification du groupement acylglucosamine hydrophobe (Figure 5). Son spectre d'activité est plus restreint que celui de l'oritavancine, avec par exemple une absence d'activité sur les ERG *vanA*, mais améliore

l'activité sur les SCN et *S. pneumoniae*, par comparaison à la teicoplanine (Tableau 1) [Pace & Yang, 2006]. Cependant, les ratios CMB/CMI sont supérieurs à ceux des glycopeptides (activité bactériostatique), et la forte liaison aux protéines plasmatiques (> 98%) laisse présager une activité inférieure *in vivo*, aux glycopeptides [Pace & Yang, 2006]. Les études cliniques ont montré une supériorité à la vancomycine chez *S. aureus*, et une non-infériorité au linézolide, avec une demi-vie prolongée autorisant uniquement 2 administrations par semaine [Seltzer et al., 2003].

☐ Telavancine

Les objectifs de la recherche sur la telavancine étaient (i) d'augmenter l'activité bactéricide de la vancomycine, (ii) restaurer l'activité sur les souches porteuses de gènes *van*, et (iii) améliorer les paramètres pharmacocinétiques/pharmacodynamiques en autorisant une administration par jour. Pour cela, un groupement decyl-aminopropyl a été ajouté au niveau du dérivé vancosamine, et un substituant hydrophile méthylamino-phosphonate a été introduit en position résorcinol (Figure 5). La solubilité a été améliorée et la formulation facilitée par utilisation de hydroxyl-propyl-β-D-cyclodextrine comme excipient dans les préparations parentérales [Pace & Yang, 2006]. La telavancine a une activité bactéricide, temps- et concentration dépendante (y compris sur les ERG *vanA* et les VRSA, Tableau I), avec un effet post-antibiotique prolongé [Barcia-Macay et al., 2006]. Des études cliniques de phase II et III sont actuellement en cours, et ont montré une équivalence de la telavancine aux traitements standards dans les infections de la peau et des tissus mous [Stryjewski et al., 2005].

Tableau I : Comparaison des activités antibactériennes (CMI) des lipoglycopeptides synthétiques avec la vancomycine (d'après [Pace & Yang, 2006]).

		Oritavancin	Dalbavancin	Telavancin	Vancomycin
MRSA	MIC range	0.12–4	0.06–1	≤0.06–2	0.5–4
MSSA	MIC range	0.12–2	0.06–0.5	0.12–2	0.25–2
MR-CoNS	MIC range	0.25–4	0.06–1	0.12–2	1–4
MS-CoNS	MIC range	0.25–1	≤0.03–0.25	0.12–2	0.12–1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MIC range	≤0.002–0.06	0.008–0.12	0.004–0.03	0.25–2
Beta-hemolytic streptococci	MIC range	0.016–0.12	≤0.03–0.12	0.03–0.12	0.5
<i>Enterococcus</i> spp., vancomycin-susceptible	MIC range	0.06–0.25	≤0.03–1	0.06–1	0.25–4
<i>Enterococcus</i> spp., VanB	MIC range	0.12–2	0.02–2	0.12–2	8–128
<i>Enterococcus</i> spp., VanA	MIC range	1–4	0.5–>128	0.12–8	>128

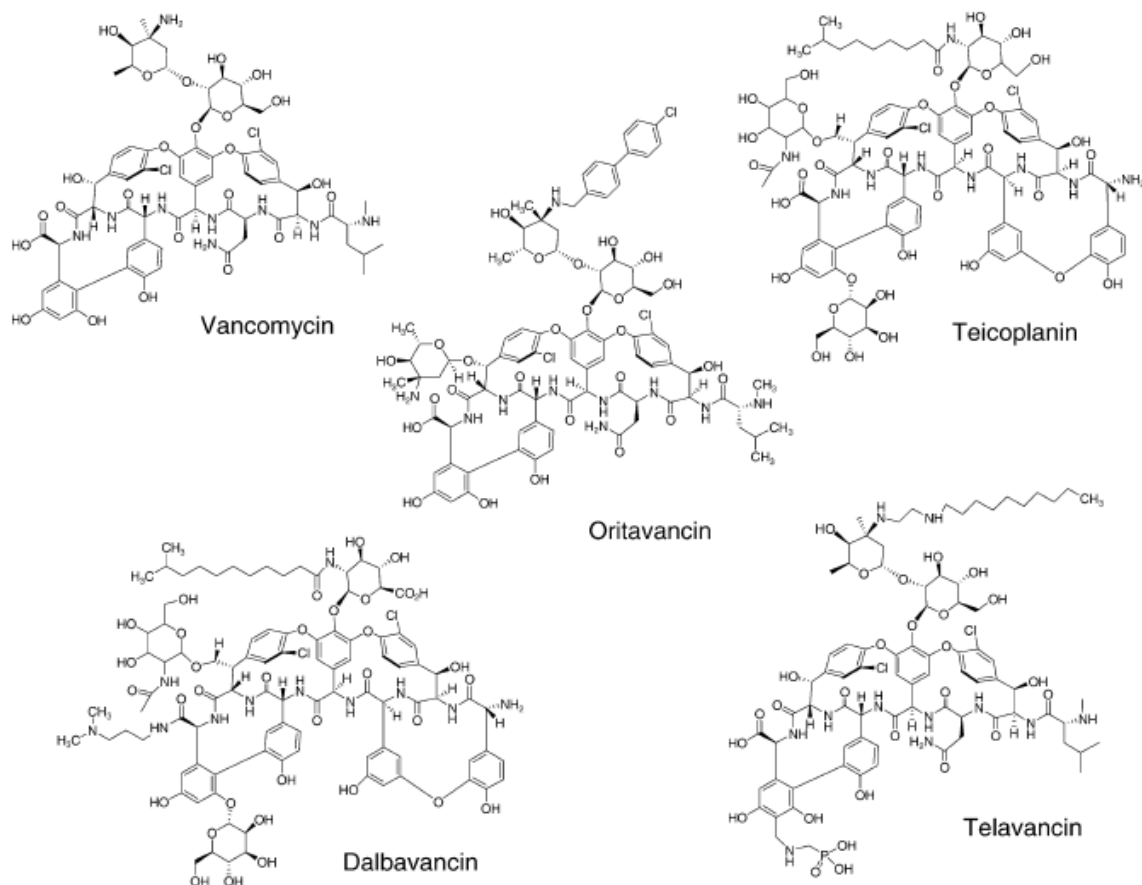


Figure 5 : Structure des glycopeptides, et des nouveaux lipoglycopeptides (d'après [Pace & Yang, 2006]).

Mais comment agissent ces glycopeptides de 2^{ème} génération, puisqu'ils sont actifs, y compris sur les souches porteuses de gènes *van* ?

De nombreuses équipes se sont penchées sur cette question. Ils ont ainsi montré que ces nouveaux dérivés agissent (i) par liaison directe et inhibition des transglycosylases, (ii) par inhibition de la synthèse des lipides, et (iii) par action directe sur la membrane cytoplasmique (désorganisation et fuite des constituants) [Higgins et al., 2005]. Les analogues lipoglycopeptidiques ne nécessitent donc pas la fixation sur le peptidoglycane, au niveau des précurseurs pentapeptidiques néoformés [Beauregard et al., 1995 ; Ge et al., 1999 ; Cooper & Williams, 1999 ; Allen et al., 2002].

1.3. Les entérocoques : particularités

1.3.1. Entérocoques et habitat : une persistance importante dans l'environnement

Le genre *Enterococcus* a été créé en 1984 pour rassembler les streptocoques fécaux du groupe D, halophiles, et capables de résister à 30 min de chauffage à 60°C. Ce genre inclut aujourd'hui 27 espèces proches par leurs caractéristiques biochimiques (structure du peptidoglycane), physiologiques (multiplication dans des conditions hostiles de culture, production de pyrrolidonyl arylamidase), antigéniques (la plupart des espèces possèdent l'antigène du groupe D de Lancefield) et génétiques. Les entérocoques sont définis par une coloration de Gram positive, un aspect ovoïde des cocci et une disposition préférentielle par paires ou courtes chaînettes [Freney et al., 2007]. L'analyse du peptidoglycane pariétal a mis en évidence une muréine composée d'enchaînements lysine-aspartate (sauf pour *E. faecalis* qui possède des enchaînements lysine-alanine), et contenant des ponts D-isoasparagine. Cette structure originale du peptidoglycane différencie les entérocoques des autres streptocoques et des lactocoques [Freney et al., 2007]. Certaines espèces sont mobiles (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*), ou pigmentées en jaune (*E. casseliflavus*). *E. faecium* et *E. gallinarum*, très proches de part leurs caractéristiques biochimiques, sont généralement distingués par le test de mobilité. *E. faecalis* possède la particularité de résister au tellurite de potassium.

Les entérocoques appartiennent à la flore résidente gastro-intestinale de l'Homme, des autres mammifères, des oiseaux et des reptiles. Ils peuvent également coloniser la bouche, les voies respiratoires supérieures, le vagin et la région périnéale. Ce sont des microorganismes ubiquitaires, que l'on retrouve aussi dans les eaux et sur les végétaux.

Ils ont la particularité d'être résistants dans de nombreuses conditions environnementales :

- à des températures allant de 10 à 45°C,
- en milieu hypo- ou hypertonique,

- en milieu acide ou alcalin,
- en condition aérobie ou anaérobies...

Les entérocoques tolèrent par ailleurs de fortes concentrations en azide de sodium ou en acides biliaires (jusqu'à 40%), propriétés largement utilisées lors de la confection de milieux sélectifs (élimination des autres bactéries de la flore commensale intestinale dans le cas de prélèvements rectaux ou de selles, par exemple) [Chavers et al., 2003]. Deux autres caractères biochimiques sont aussi à retenir :

- l'**hydrolyse de l'esculine en esculétine** (noircissement caractéristique du milieu bile-esculine)
- la **présence d'une pyrrolidonyl arylamidase** (réaction dite PYR+).

Ces capacités en font un pathogène capable de persister pendant de longues périodes (plusieurs mois) dans l'environnement, hospitalier par exemple, sur toute surface ayant été en contact avec un élément souillé. Ainsi, dans une revue récente, Kramer et al. ont montré que les entérocoques sont capables de persister de 5 jours à 4 mois, sans différence de survie en fonction du profil de résistance aux antibiotiques (même persistance des souches « sauvages » que des ERG multi-résistants) [Kramer et al., 2006].

1.3.2. Entérocoques et pouvoir pathogène : colonisation ou infection ?

Plus de 20 espèces d'entérocoques ont été identifiées jusqu'à présent, mais deux seulement sont responsables de la majorité des infections survenant en clinique humaine. Jusqu'à très récemment, la majorité des infections cliniques étaient causées par *Enterococcus faecalis* (environ 80% cas), suivi par *Enterococcus faecium*. Ainsi, selon les données du SENTRY Antimicrobial Surveillance Program en 2003, les souches de *E. faecalis* représentent 57,2% à 78,6% des isolats, chiffre variable selon les pays [Deshpande et al., 2007]. Les autres espèces (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*...) sont isolées très rarement, et représentent ainsi moins de 5% des isolats diagnostiques [Depardieu & Courvalin, 2005].

Le pouvoir pathogène des entérocoques reste sujet à controverse. A la faveur d'une diminution des défenses de l'hôte, les entérocoques peuvent entraîner des infections invasives. Les entérocoques sont des bactéries opportunistes, fréquemment responsables d'infections nosocomiales. Même s'ils sont moins virulents que les autres bactéries à Gram +, les entérocoques peuvent causer divers syndromes cliniques incluant endocardites, bactériémies (les entérocoques apparaissent au 3^{ème} rang des causes de bactériémies aux Etats Unis et au Canada) [Edwards et al., 2007], méningites, infections urinaires et être associés à des infections telles que péritonites et abcès intra-abdominaux. Le plus souvent, une procédure invasive à visée diagnostique ou thérapeutique (sondage urinaire, endoscopie) est l'élément responsable de la bactériémie. Elles peuvent alors gagner le cœur et se fixer sur les valves cardiaques. Les entérocoques représentent 8% des microorganismes responsables d'endocardite [Freney et al., 2007].

L'isolement d'un entérocoque dans les urines ou dans un prélèvement pluribactérien peut poser un problème d'interprétation. La difficulté réside en la différenciation entre une simple colonisation et une réelle infection, problématique soulevée de nouveau lors des épidémies à ERG. Ainsi, Schmitt et al., dans une étude assez ancienne maintenant, avaient montré qu'au moins un tiers des souches isolées au laboratoire correspondait plus à une colonisation qu'à une infection symptomatique [Schmitt et al., 1994].

1.3.3. Entérocoques et antibiotiques : des bactéries naturellement résistantes

Les entérocoques occupent aujourd'hui une place importante en pathologie et posent bien souvent un problème thérapeutique du fait de leur résistance naturelle à la plupart des antibiotiques : céphalosporines, monobactames, lincosamides pour *E. faecalis*, résistance de bas niveau aux aminosides (avec conservation de la synergie avec les β -lactamines), acide fusidique, fosfomycine. Ils sont par ailleurs « tolérants » aux pénicillines (rapport CMB/CMI > 32), en raison d'une faible affinité de leurs PLPs (en particulier la PLP5). A cela s'ajoute une résistance fréquente à l'ampicilline (pour *E. faecium* en particulier, avec conservation de l'activité de l'imipénème), du fait d'une hyperproduction

ou d'une altération de la PLP5, ainsi qu'une résistance acquise à haut niveau aux aminosides, aux fluoroquinolones, aux tétracyclines, aux macrolides-lincosamides-synergistines-kétolides ... La synergie bactéricide entre les β -lactamines ou les glycopeptides, et les aminosides, est indispensable au traitement d'infections sévères telles que les endocardites et les méningites [Depardieu & Courvalin, 2005]. Cette synergie s'explique par le fait que la pénicilline se fixe sur les PLP, ce qui induit une déstructuration de la paroi et permet l'accumulation intracytoplasmique de l'aminoside.

Jusqu'à la fin des années 1980, la vancomycine était le seul antibiotique à notre disposition pour faire face aux infections dues à des entérocoques multirésistants. L'émergence de souches résistantes aux glycopeptides a fait naître l'inquiétude d'une impasse thérapeutique. Peu de molécules restent alors disponibles : quinupristine-dalfopristine (nécessitant une voie veineuse centrale pour cause de veinotoxicité) et linézolide (antibiotique hématotoxique, pouvant entraîner des neuropathies périphériques au delà de 21 j de traitement, avec risque de cécité irréversible). Cependant, la quinupristine-dalfopristine est presque toujours inactive sur *E. faecalis* du fait de la résistance intrinsèque de cette espèce à la dalfopristine (efflux). Et les 1^{ères} souches d'*Enterococcus faecium vanA* résistantes au linézolide ont été décrites [Bonora et al., 2006]...

Les nouveaux lipoglycopeptides, ainsi que la daptomycine ou la tigécycline, pourront-ils représenter une nouvelle alternative ? Ou la remarquable adaptation des entérocoques sera-t-elle plus efficace ?

1.4. Entérocoques versus Glycopeptides

Les cocci à Gram + sont des causes fréquentes d'infections nosocomiales, en particulier d'endocardites et de septicémies. La dissémination de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et d'Entérocoques résistants aux Glycopeptides (ERG) est particulièrement inquiétante. Les épidémies intra-hospitalières sont typiquement le résultat de l'expansion d'un clone, transféré de patient à patient, ou de façon manuportée par l'intermédiaire du personnel soignant. Le passage des gènes *van* codant la résistance aux glycopeptides aux SARM, souvent retrouvés comme co-

colonisateurs chez les patients porteurs d'ERG, serait dramatique. Pour une revue générale sur les entérocoques résistants aux glycopeptides, voir [Cetinkaya et al., 2000].

1.4.1. Épidémiologie de la résistance

Les infections à entérocoques sont difficiles à traiter, non seulement du fait de la multiplication des résistances, mais aussi du fait que ce sont des bactéries « tenaces », avec une grande capacité de dissémination entre patients au sein d'un service hospitalier. Les glycopeptides ont été commercialisés dans les années 50. D'abord réservés comme traitement de 2^{ème} intention du fait de leur néphrotoxicité et de leur ototoxicité non négligeables, leur usage a connu un regain d'intérêt avec l'apparition des SARM. Le 1^{er} isolat clinique d'*Enterococcus* spp. résistant à la vancomycine a été décrit en France en 1988 [Leclercq et al., 1988], puis rapidement en Angleterre [Uttley et al., 1988] et aux Etats Unis [Sahm et al., 1989]. Deux phénomènes rendent compte de la dissémination de cette résistance : des épidémies de souches clonales d'ERG dans les hôpitaux et le transfert horizontal de plasmides entre souches de *E. faecium*, et de *E. faecium* à d'autres espèces d'entérocoques, dont *E. faecalis*.

L'apparition de cette résistance est relativement tardive si l'on considère le délai depuis la mise sur le marché des glycopeptides, c'est-à-dire presque 40 ans. Ce délai peut être comparé à celui, beaucoup plus court, d'apparition de la résistance à la pénicilline G chez les staphylocoques (commercialisation en 1941, 1^{ères} résistances en 1944), ou même de la résistance à la méticilline (mise sur le marché en 1959, 1^{ères} résistances en 1961). Depuis ces premières descriptions, leur prévalence connaît une augmentation considérable.

Les données épidémiologiques recueillies ces 20 dernières années ont montré l'émergence d'entérocoques, en particulier *E. faecium*, comme pathogènes responsables d'infections nosocomiales, qui semblent être due à l'expansion d'un complexe clonal (CC-17) [Leavis et al., 2006 ; Top et al., 2008]. La structure de la population de *E. faecium* a été élucidé par MLST et a révélé l'existence de ce clone, associé à la majorité des épidémies hospitalières et des infections cliniques sur les cinq continents. La répartition des *E. faecium* dans différents complexes clonaux est présentée Figure 6.

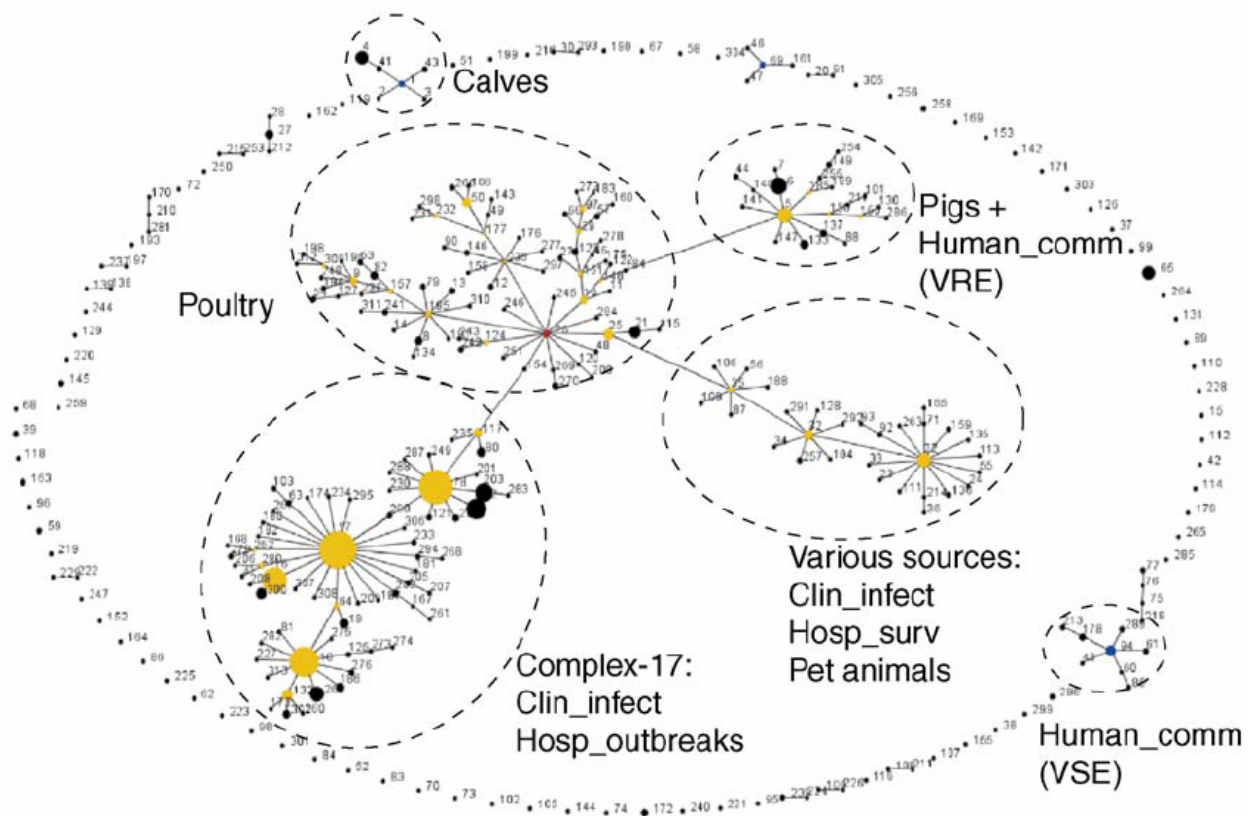


Figure 6 : Répartition en clones de 855 souches d'*E. faecium* sur la base des profils alléliques obtenus par MLST ; selon l'algorithme de eBURST (d'après [Leavis et al., 2006]).

Sont représentés le clone CC-17 qui regroupe l'ensemble des souches isolées d'infections cliniques et d'épidémies hospitalières, ainsi que d'autres souches retrouvées soit chez les animaux (volailles, bétail, cochons, animaux domestiques), soit chez l'Homme lors de cas sporadiques.

Ce complexe clonal CC-17 est corrélé à la résistance à l'ampicilline et aux fluoroquinolones, ainsi qu'à la présence d'un îlot de pathogénicité, portant les gènes *esp* et *hly* (deux gènes de virulence codant respectivement une « enterococcal surface protein » et une hyaluronidase) [Ergani-Ozcan et al., 2008]. Les études préliminaires par MLST suggèrent l'existence de complexes clonaux hospitaliers similaires chez *E. faecalis* [Leavis et al., 2006]. Ces données suggèrent que l'adaptation de CC-17 au milieu hospitalier s'est effectuée par étapes, impliquant l'acquisition séquentielle (transfert horizontal de gènes, recombinaisons, mutations) de mécanismes procurant à ce complexe clonal un avantage sélectif certain. Cela a résulté en une population d'entérocoques particulièrement bien adaptés à la survie et à la dissémination dans les hôpitaux. Dans une étude récente, Werner et al. ont réalisé l'étude épidémiologique de souches d'ERG isolées dans divers hôpitaux allemands. Ils ont ainsi montré que (i) toutes les souches appartiennent au CC-17 ; (ii) expriment une résistance à l'ampicilline, à la

vancomycine, à la ciprofloxacine ; (iii) seules 4 souches ne possèdent aucun marqueur de virulence (ni *esp*, ni *hly*) ; et (iv) possèdent un cluster *vanA* variable [Werner et al., 2007b]. Une étude similaire par Borgmann et al. a montré des différences entre les souches nosocomiales et communautaires. Toutes les souches d'ERG responsables d'infections nosocomiales font partie du complexe clonal CC-17, avec une résistance à l'ampicilline ; les souches communautaires font partie d'autres clones, et sont généralement porteuses du gène *esp* [Borgmann et al., 2007].

☐ Dans le monde

Selon le rapport du National Healthcare Safety Network (NHSN) en 2007, 30% des entérocoques isolés dans les USI aux Etats Unis sont des ERV [Edwards et al., 2007]. Dans ces unités, la proportion de souches d'ERG est passée de moins de 1% en 1989 à 28% en 2003 (Figure 7). Les rapports les plus récents concernant les Etats Unis sont particulièrement alarmants puisque certains auteurs font état de plus de 70% de ERG parmi les entérocoques isolés d'hémocultures, dans certains services hospitaliers [Karlowsky et al., 2004].

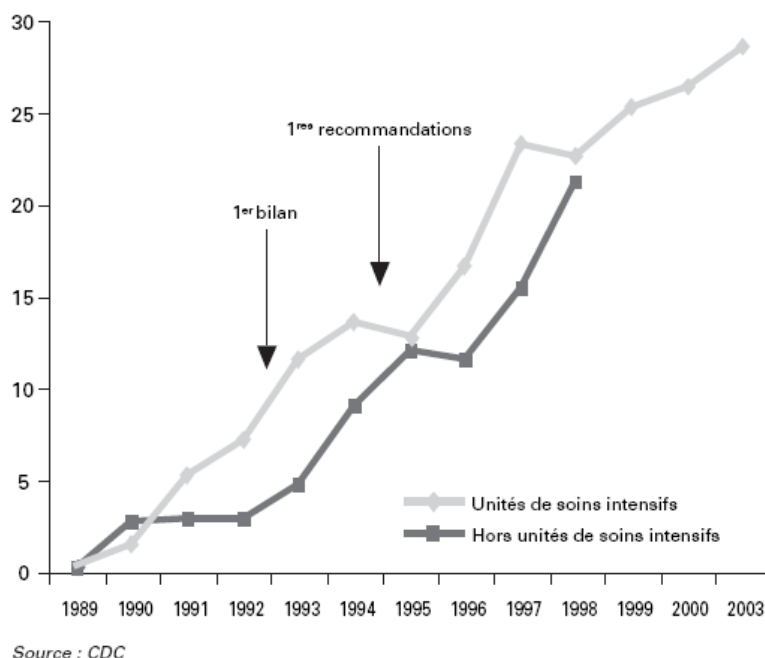


Figure 7 : Proportion de résistance à la vancomycine chez les entérocoques, Etats Unis, 1989-2003 (d'après [Leclercq et al., 2006]).

Des épidémies hospitalières ont aussi été signalées en Asie [Fujita et al., 1998] et en Australie. Mais par comparaison aux Etats Unis et à l'Europe où VanA est le mécanisme de résistance prédominant, la résistance de type VanB prédomine en Australie et à Singapour [Yang et al., 2007]. Quant à l'Amérique latine, les ERG sont responsables de 1 à 5% des septicémies [Biedenbach et al., 2004].

☐ En Europe

L'EARSS est bien moins alarmant quant à l'état des lieux en Europe : 0,9% des souches d'*E. faecalis* et 9% des souches d'*E. faecium* isolées d'infections nosocomiales sont des ERG [EARSS, 2005]. Dans la plupart des pays, la fréquence de la résistance à la vancomycine est < 1% , exception faite de la Grèce (37%), de l'Irlande (31%), ou d'Israël (46%) (Figure 8, A). Durant les 4 dernières années, certains pays ont connu une augmentation significative de la résistance aux glycopeptides, cette augmentation correspondant généralement à des épidémies hospitalières. De telles notifications ont par exemple été réalisées en Grande Bretagne [Goossens et al., 2003], en Italie [Bonadio et al., 2000] ou en France [Leclercq et al., 2006].

Concernant la résistance de haut niveau aux aminosides, la fréquence est très variable selon les pays européens : d'une absence en Islande à 54% en Grèce ! La majorité des pays se situent entre 25 et 50 %, à l'exception de la France (15%), de la Suède (19%) et de la Bulgarie (24%) (Figure 8, B) [EARSS, 2005].

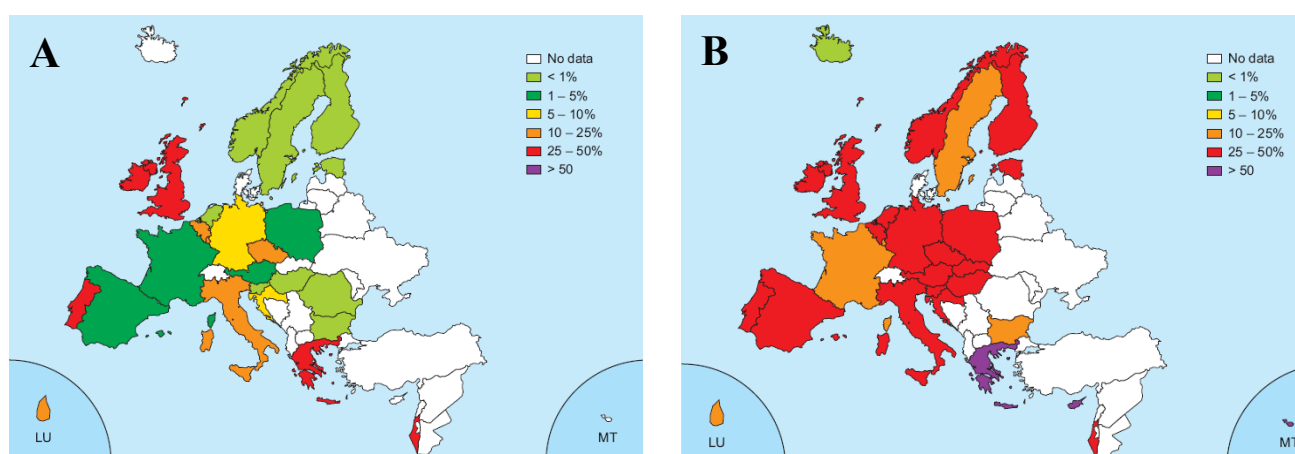


Figure 8 : *Enterococcus faecium* : fréquence de la résistance à la vancomycine (A) et de la résistance de haut niveau aux aminosides (B) en Europe en 2005 (d'après [EARSS, 2005]).

☐ En France

En France, la situation est restée stable jusqu'en 2004 (prévalence estimée à moins de 2%), bien que de petites épidémies aient été signalées. Paradoxalement, des études datant de la fin des années 1990 avaient montré, en milieu extra-hospitalier, qu'un pourcentage non négligeable de personnes saines héberge des ERG dans les selles, jusqu'à 9% dans une population de sujets jeunes et en bonne santé [Guérin et al., 1998].

Entre 2001 et 2006, 111 signalements ont été effectués par 63 établissements différents, regroupant 763 cas au total (24 cas d'infections groupés) : 20% d'infections et 80% de colonisations (Figure 9). Trois centres hospitaliers ont fait l'objet d'épidémies d'ampleur inhabituelle (Nancy, Clermont Ferrand et divers hôpitaux de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, APHP). Parmi ces signalements, 80% étaient des *E. faecium*, 15% des *E. faecalis*, et 5% des *Enterococcus* spp.

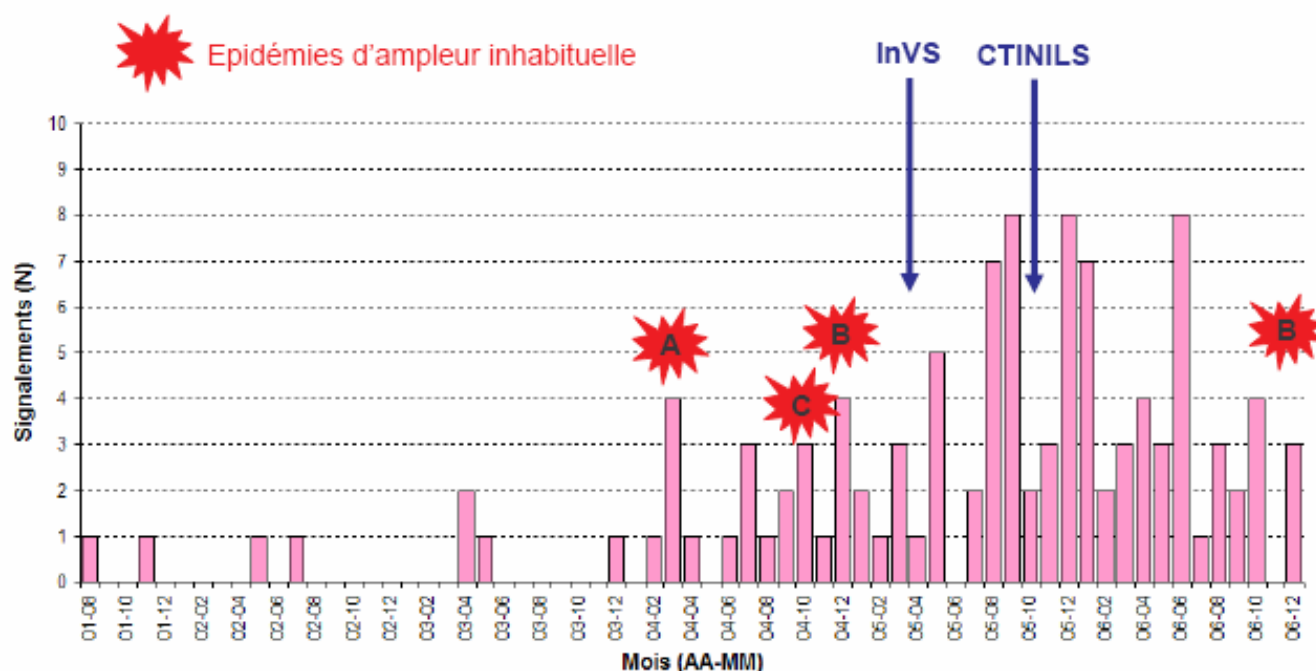


Figure 9 : Nombre de signalements d'isolement d'ERG en France, entre 2001 et 2006 (données InVS au 11/01/2007).

Parmi les souches isolées en milieu hospitalier, 17 clones différents ont pu être identifiés, avec généralement 1 clone prédominant par établissement de soins, ou par région (Figure 10).



Figure 10 : Répartition des différents clones d'ERG, en France, 2005-2006.

De façon surprenante la majorité des ERG sont des *E. faecium*. Les données du SENTRY Program en 2003, ont montré que parmi les souches résistantes aux glycopeptides, 91% étaient des *E. faecium*, et 7,8% des *E. faecalis* [Deshpande et al., 2007]. Aux Etats Unis, il a été montré que la résistance à la vancomycine et à la teicoplanine est plus fréquente chez les souches de *E. faecium* que chez les souches de *E. faecalis* isolées de bactériémies nosocomiales entre 1995 et 1997. La prévalence des *E. faecium* résistants à la vancomycine a augmenté de 26,2% en 1995 à 39,2% en 1996, pour atteindre 48,8% en 1997. Pour *E. faecalis*, cette prévalence est restée minime, avec des valeurs respectivement de 1,9%, 1,3% et 1,4% pour les mêmes années [Sahm et al., 1999]. Aucune explication n'a été trouvée à ce jour pouvant expliquer la prévalence plus importante des gènes de résistance chez *E. faecium*.

1.4.2. Mécanismes de la résistance chez les entérocoques... mais aussi chez les staphylocoques !

1.4.2.1. Gènes *van* chez les entérocoques

Les glycopeptides n'interagissent pas avec les enzymes de la biosynthèse de la paroi mais forment des complexes avec les précurseurs du peptidoglycane et empêchent leur incorporation dans la paroi. L'activité des glycopeptides n'est donc pas déterminée par leur affinité pour des enzymes cibles mais par la spécificité de substrat des enzymes qui détermine la structure des précurseurs du peptidoglycane. La résistance aux glycopeptides est due à la présence d'**opérons** ou de **clusters de gènes** codant des enzymes pour :

- (i) la synthèse de précurseurs de faible affinité dans lesquels le DAla terminal est remplacé par un DLac ou une DSer ;
- (ii) l'élimination des précurseurs de haute affinité normalement synthétisés par la bactérie [Courvalin, 2006].

☐ Support génétique de la résistance

Cette résistance aux glycopeptides existe de façon naturelle chez certaines espèces d'entérocoques. Ainsi, la résistance naturelle de type VanC est présente chez les espèces *E. gallinarum* [Leclercq et al., 1992], *E. casseliflavus* et *E. flavescens* [Navarro et al., 1994], qui sont naturellement résistantes à de faibles concentrations de vancomycine, mais sont sensibles à la teicoplanine. Trois gènes sont requis pour l'expression de la résistance VanC :

- une **racémase VanT** : possède des activités sérine et alanine racémase, et son domaine transmembranaire est responsable de la capture de LSer dans le milieu extérieur.
- une **ligase VanC** : catalyse la formation du dipeptide DAla-DSer qui remplace le DAla-DAla dans les précurseurs du peptidoglycane.

- une protéine **VanXY_C**, qui possède à la fois les activités **D,D-di-peptidase** et **D,D-carboxypeptidase**, et est responsable de l'hydrolyse des résidus DAla terminaux. Cependant, cette enzyme est incapable d'agir au niveau des précurseurs pentapeptidiques ; sa séquence est plus proche de VanY que de VanX.

La substitution du DAla terminal par une DSer n'altère pas les liaisons hydrogène mais le remplacement du groupement méthyl par un hydroxyméthyl résulte en un encombrement stérique important, qui entraîne une affinité réduite pour la vancomycine (Figure 11A) [Courvalin, 2006]. Trois clusters de gènes *vanC* ont été décrits : *vanC1* chez *E. gallinarum*, *vanC2* chez *E. casseliflavus* et *vanC3* chez *E. flavescens*. Les gènes *vanC2* et *vanC3* présentent 97 à 100% d'identité, il est donc très difficile de distinguer les deux espèces porteuses de ces gènes.

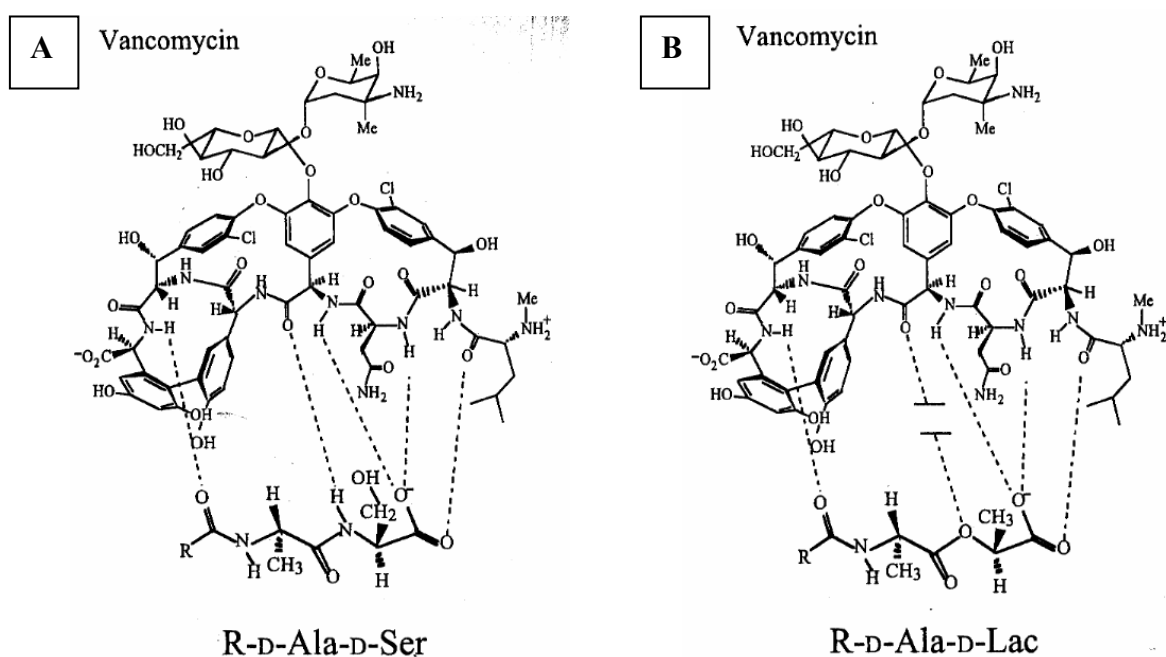


Figure 11 : Interaction entre la vancomycine et les précurseurs du peptidoglycane.

- (A) DAla-DSer (substitution du groupement CH₃ par CH₂OH, induisant un encombrement stérique).
- (B) DAla-DLac du peptidoglycane (substitution d'un groupement NH par un oxygène, prévenant la formation de la liaison hydrogène centrale). D'après [Depardieu & Courvalin, 2005].

La structure des opérons responsables de la résistance acquise est très semblable à celle de l'opéron *vanC*. La résistance acquise de type VanA a été la 1^{ère} décrite et est médiée par le **transposon Tn1546** [Arthur et al., 1993]. Elle est caractérisée par une résistance à haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. L'opéron *vanA* code :

① **des enzymes permettant la synthèse de précurseurs de faible affinité :**

1. une **deshydrogénase VanH** : réduit le pyruvate en D-Lac (Figure 12).
2. une **ligase VanA** : catalyse la formation d'une liaison ester entre DAla et DLac (Figure 12).

Le depsipeptide DAla-DLac remplace ainsi le dipeptide DAla-DAla dans la voie de synthèse du peptidoglycane. Cette substitution élimine une liaison hydrogène essentielle pour la fixation des glycopeptides et réduit considérablement leur affinité pour la cible (Figure 11B). Les PLP tolèrent la substitution de DAla en DLac. Cependant, les transpeptidases responsables de l'assemblage final du peptidoglycane semblent avoir une cinétique d'activité différente sur les précurseurs DAla ou DLac, ce qui peut modifier la densité des ponts interpeptidiques [Depardieu & Courvalin, 2005]. Cela peut aussi avoir une autre incidence. Ainsi, des auteurs ont montré que l'induction de la résistance aux glycopeptides est associée à une augmentation de la sensibilité aux β -Lactamines chez certaines souches d'entérocoques [Al-Obeid et al., 1992].

② **une enzyme permettant l'élimination des précurseurs de haute affinité :**

3. une **dipeptidase VanX** : hydrolyse le dipeptide DAla-DAla synthétisé par la ligase Ddl de la bactérie (Figure 13).

En effet, la coproduction de précurseurs se terminant par DAla-DAla ne permet pas l'expression de la résistance aux glycopeptides. Dans ces conditions, la liaison des glycopeptides aux précurseurs pentapeptidiques normaux séquestre les transporteurs lipidiques au niveau de la face externe de la

membrane cytoplasmique, ce qui prévient la translocation d'autres précurseurs, y compris ceux se terminant par DAla-DLac [Depardieu et Courvalin, 2005].

L'interaction des glycopeptides avec leur cible DAla-DAla est ainsi prévenue par l'élimination des précurseurs pentapeptidiques terminés par DAla, à la fois par l'action de VanX et de VanY, une enzyme accessoire [Courvalin, 2006] (Figure 13).

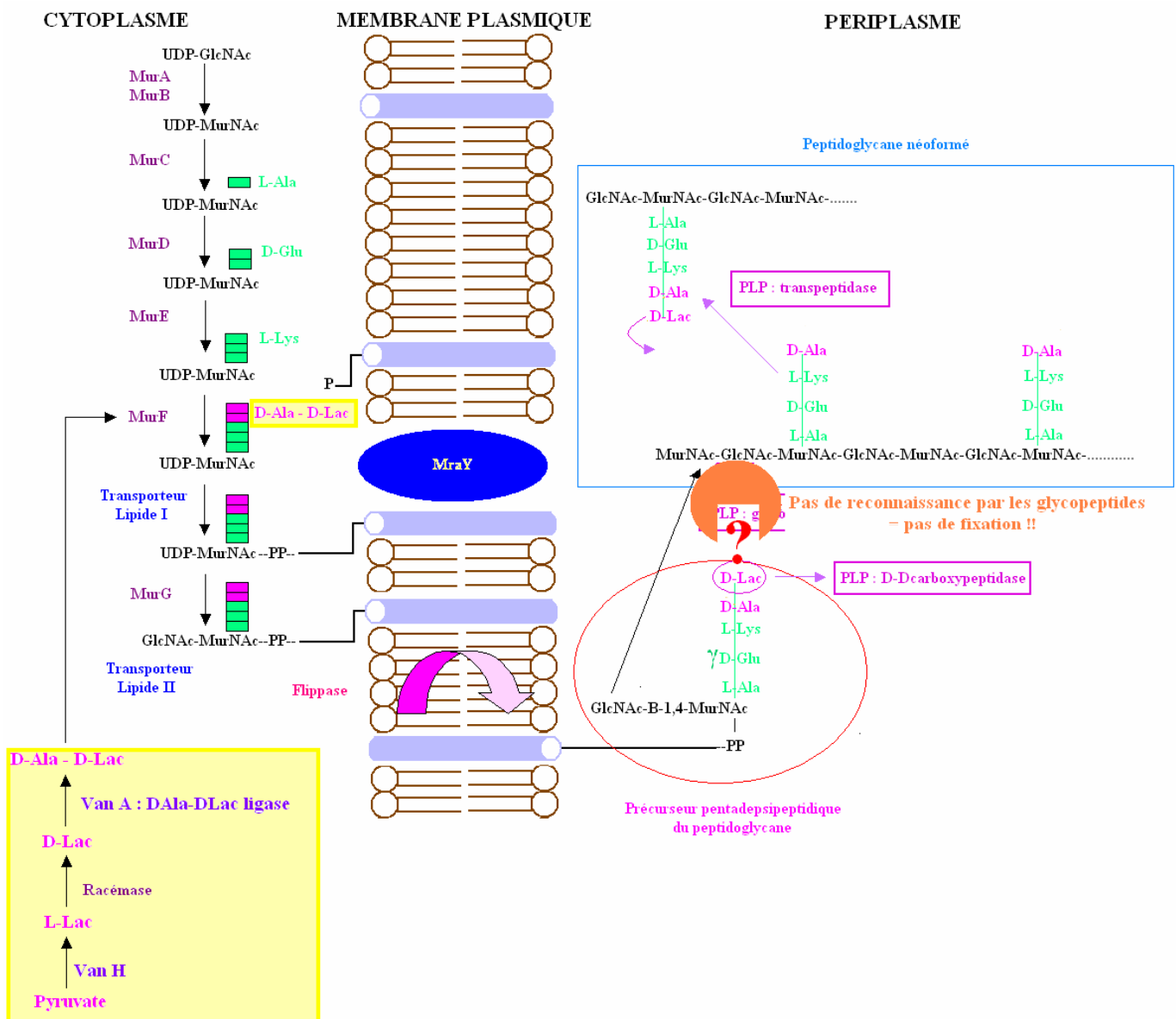
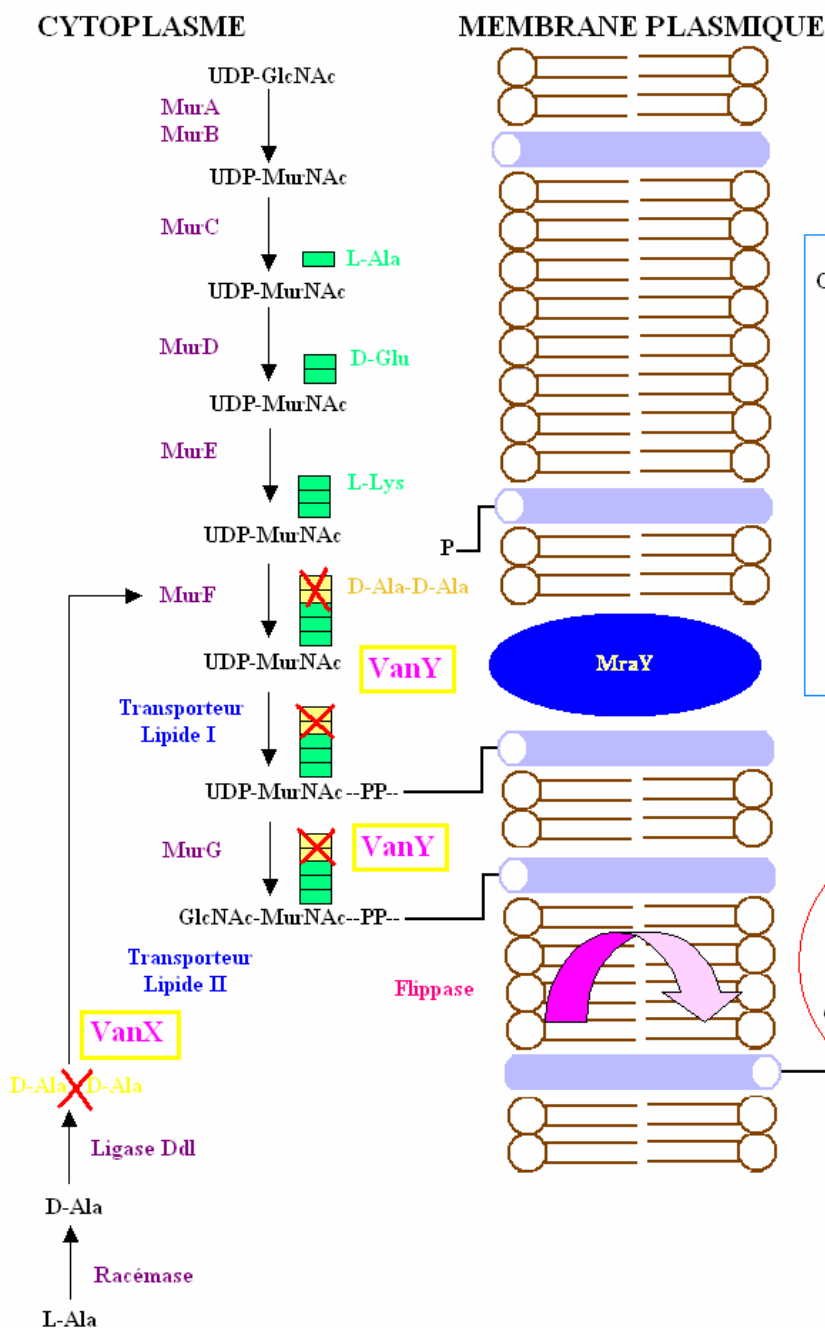


Figure 12 : Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentapeptidiques chez une souche d'*Enterococcus faecium* vanA. Niveaux d'action de VanA et VanH.

③ Ainsi que des enzymes accessoires, non essentielles à l'expression de la résistance, mais augmentant le niveau de résistance à la vancomycine et à la teicoplanine, respectivement :

4. une **D,D-carboxypeptidase VanY** : enlève le DAla C terminal des précurseurs lorsque l'élimination du DAla-DAla par VanX est incomplète. Cette carboxypeptidase Zn^{2+} dépendante est insensible à l'action des pénicillines.
5. **VanZ**, protéine de fonction inconnue, conférant par sa seule expression une résistance à la teicoplanine, par un mécanisme demeurant encore inconnu [Arthur et al., 1995].



G. Figure 13 : Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentapeptidiques normaux chez une souche d'*Enterococcus faecium* *vanA*. Niveaux d'action de VanX et VanY.

Une étude récente menée au Portugal a montré la diversité importante du transposon Tn/546, reflet d'une épidémiologie complexe, associant à la fois une dissémination clonale et la dissémination du plasmide porteur de ce transposon au sein de différentes souches. L'hétérogénéité apparente de ce transposon chez les entérocoques isolés chez l'Homme, chez l'animal et dans l'environnement est le reflet de nombreux échanges génétiques et de l'évolution parallèle d'éléments génétiques à haute capacité de dissémination [Novais et al., 2008].

La structure comparée des différents types d'îlots de résistance (*vanC*, *vanA*, *vanB*, *vanD*) est présentée Figure 14.

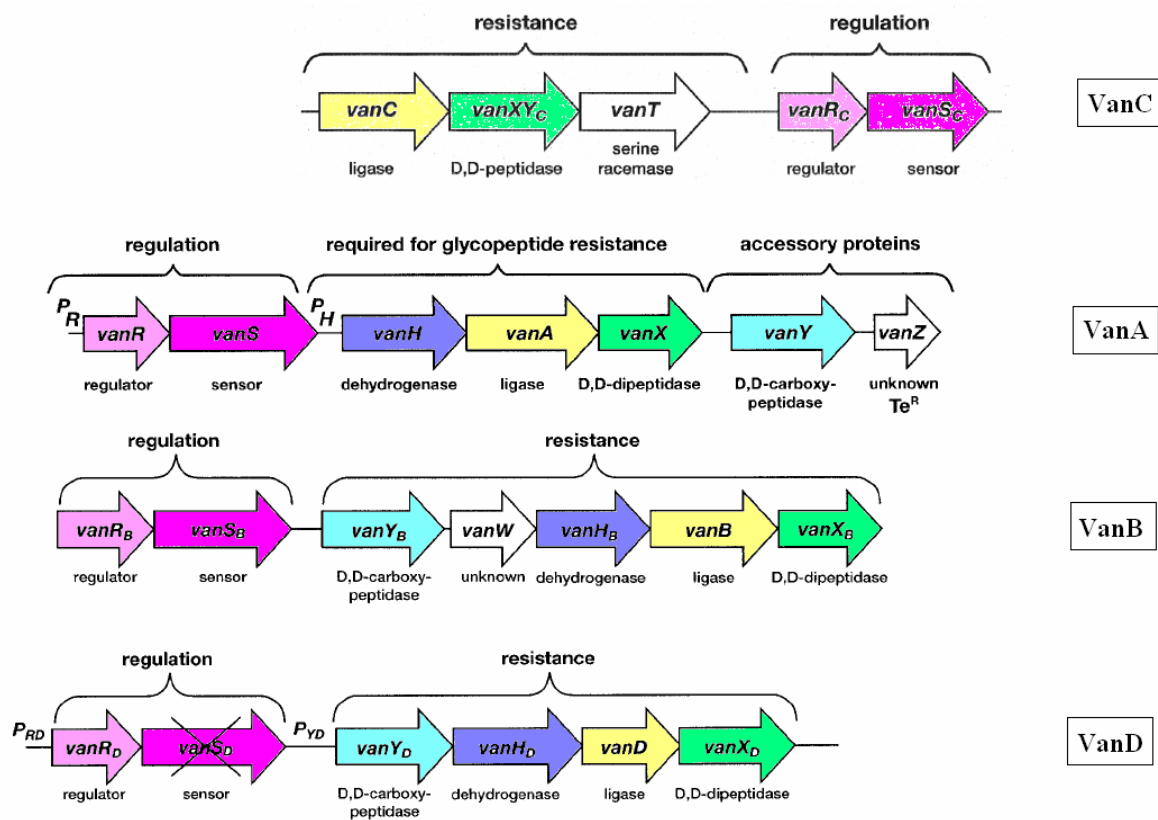


Figure 14 : Résistances de type VanC, VanA, VanB et VanD.

Organisation des différents types d'opéron, les flèches indiquent les gènes et la direction de la transcription. P_R : Promoteur des gènes de régulation ; P_H : Promoteur des gènes de résistance (d'après [Courvalin, 2006]).

La résistance acquise de type VanD est due à la **production constitutive de précurseurs du peptidoglycane terminés par DAla-DLac**. La ligase Ddl est inactive. Ainsi, les souches porteuses des gènes *vanD* ne pourraient se développer qu'en présence de vancomycine, la synthèse du peptidoglycane dépendant exclusivement de cette voie inductible. Ce n'est cependant pas le cas puisque le cluster *vanD* est exprimé de façon constitutive, par le jeu de mutations au niveau du sensor VanS_D et du régulateur VanR_D [Courvalin, 2006].

▣ Régulation de la résistance aux glycopeptides

L'expression de la résistance VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, et VanG est régulée par un système à deux composantes VanS/VanR, un système de transduction du signal. Pour les opérons *vanA*, *vanB*, *vanD* et *vanG*, les gènes codant ce double système sont situés en amont des gènes de résistance, alors que pour *vanC* et *vanE*, ils sont situés en aval [Depardieu & Courvalin, 2005]. Nous prendrons l'exemple de la résistance VanA pour expliquer le fonctionnement de ce système de régulation.

- Van A

La régulation est assurée par un système de régulation à deux composantes, **VanS/VanR**, qui module la transcription du cluster de gènes de résistance :

- **VanS** : histidine kinase de classe I qui possède des boîtes conservées H, N, G1, F, G2. VanS comprend : (i) un domaine N-terminal avec deux segments transmembranaires, récepteur pour les glycopeptides, et (ii) un domaine C-terminal cytoplasmique avec une activité kinase. Cette protéine transmembranaire possède différentes activités : auto-phosphorylation, phosphatase et phosphotransférase. **VanR** : activateur de la transcription, situé au niveau cytoplasmique.

Ce système fonctionne de la façon suivante (Figures 15 et 16) :

① En présence de glycopeptides :

- le domaine cytoplasmique VanS catalyse une auto-phosphorylation ATP-dépendante, au niveau d'un résidu spécifique histidine.
- ce groupement phosphate est ensuite transféré au niveau d'un résidu aspartate de VanR.
- VanR ainsi activé par phosphorylation, active à son tour le promoteur PR. Cela entraîne la transcription des gènes de régulation puis l'activation du promoteur PH et la transcription des gènes de résistance.

La vancomycine et la teicoplanine sont inducteurs de VanS.

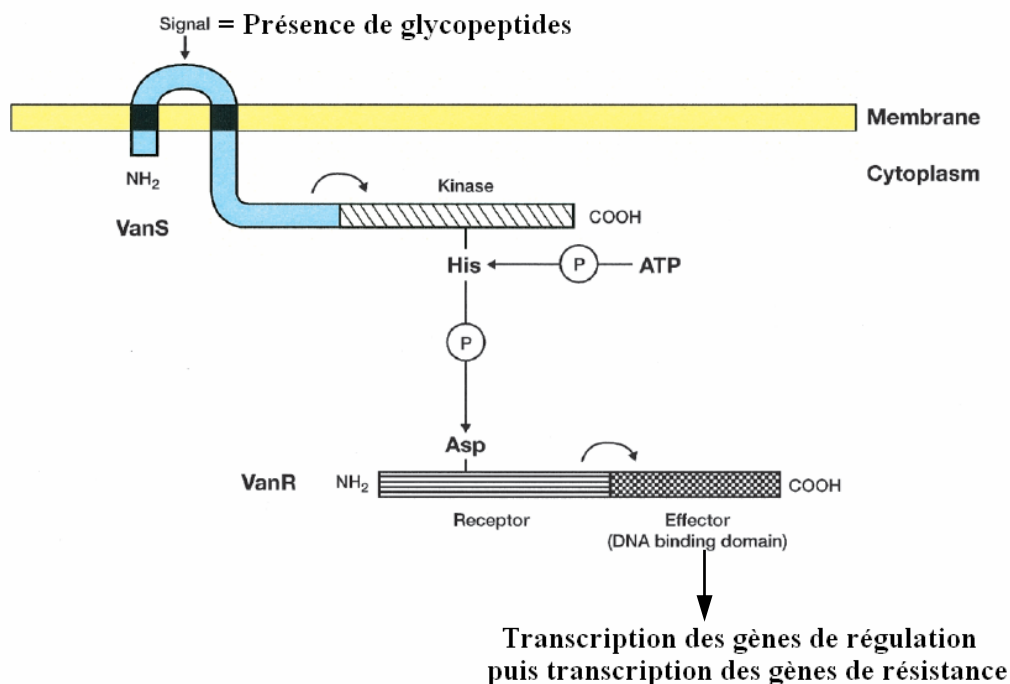


Figure 15 : Système de régulation à deux composantes VanR/S. Asp : aspartate ; His : histidine ; P : phosphate (modifié d'après [Courvalin, 2006]).

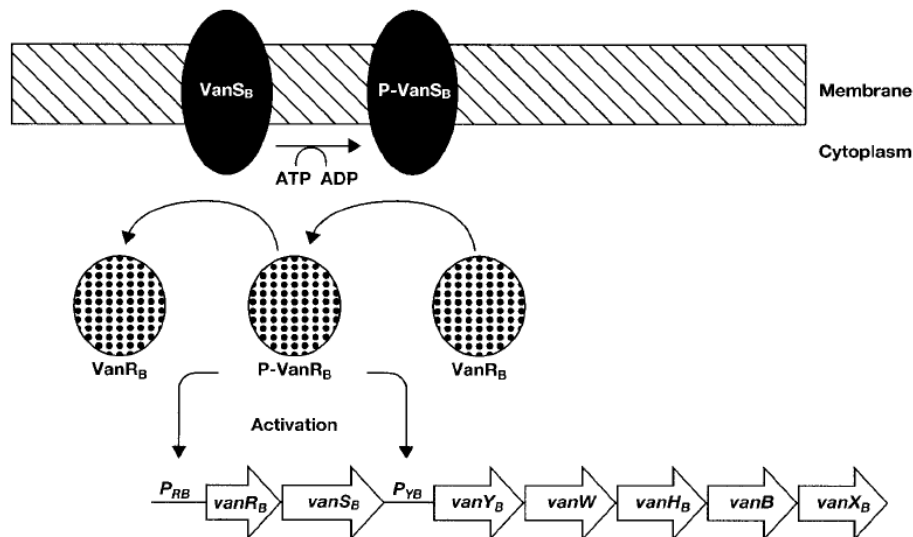


Figure 16 : Régulation positive et négative de la phosphorylation de l'activateur de transcription VanR, par le récepteur VanS (d'après [Courvalin, 2006]).

Les flèches représentent l'opéron *vanB* et indiquent la direction de transcription. Les gènes de régulation et de résistance sont co-transcrits, respectivement après activation des promoteurs P_{RB} et P_{YB} . ADP : adénosine diphosphate.

② En absence de glycopeptides, c'est l'activité phosphatase de VanS qui est stimulée, entraînant une déphosphorylation de VanR, et ainsi une régulation négative des promoteurs PR/PH.

VanS module ainsi le niveau de phosphorylation de VanR grâce à ses activités kinase/phosphatase, régulant la transcription du cluster de gènes de résistance.

- **VanB**

L'organisation et les fonctions du cluster *vanB* sont similaires à celles de *vanA* mais diffèrent dans sa régulation, puisque **seule la vancomycine est inductrice de ce cluster**. Des mutations ou des délétions au niveau de *vanS_B* peuvent conduire à une résistance non plus inductible, mais constitutive [Depardieu et al., 2003b].

☐ Origine des gènes de résistance

Le transposon Tn1546 portant l'opéron *vanA* est hautement conservé, quelle que soit la souche considérée, et son origine géographique. Cela suggère une origine commune et une diversification après transfert. Le % en GC est de 43% pour l'opéron *vanA*, et de 48% pour l'opéron *vanB*, ce qui est supérieur au % de GC retrouvé dans le génome de *E. faecium* (39%) ou de *E. faecalis* (38%). Il est donc évident que la résistance aux glycopeptides a une origine extra-chromosomique et que les clusters sont probablement composés de gènes issus de sources diverses [Depardieu & Courvalin, 2005]. Lorsque l'on analyse les ligases type DAla-DAla retrouvées chez des espèces naturellement résistantes aux glycopeptides telles que les *Lactobacillus* spp., on constate qu'elles sont assez éloignées de celles retrouvées chez les *Enterococcus* spp.

Une autre source possible est celle représentée par les espèces sécrétrices de glycopeptides chez lesquelles on a identifié des gènes homologues à *vanA*, *vanH* et *vanX* : *Amycolatopsis orientalis*, ou *Streptomyces toyocaensis* (chez laquelle on a aussi retrouvé des gènes *vanR/vanS* mais éloignés d'une vingtaine de kilobases des gènes de résistance). Cependant, le % en GC est d'environ 60%, ce qui est bien supérieur à ce qui est observé pour les séquences *vanA/H/X*. Cela conduirait à penser que l'acquisition des gènes de résistance par les entérocoques n'est pas un événement récent. Cependant, aucune espèce productrice de glycopeptides ne synthétise de précurseurs DAla-DSer, l'origine des opérons *vanC/E/G* serait donc autre que celle des opérons *vanA/B/D*.

Des phénotypes VanB ont été identifiés chez certaines souches de *Clostridium* spp. et des phénotypes VanD ou VanG-like chez d'autres bactéries anaérobies de la flore digestive (*Ruminococcus* spp., [Domingo et al., 2007]). Des phénotypes VanA ont été retrouvés chez des souches de *Paenibacillus* spp., isolées du sol [Guardabassi et al., 2005]. Ces espèces joueraient-elles un rôle de réservoir de gènes de résistance ?

La question de l'origine des gènes de résistance reste entière...

☐ Phénotypes de résistance

Six types de résistance ont été individualisés sur des critères phénotypiques et génotypiques. Cinq résultent d'une résistance acquise (VanA, B, D, E, G) et un (VanC) est une propriété intrinsèque de certaines espèces telles que *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*. La classification de la résistance aux glycopeptides est maintenant fondée sur la séquence primaire des gènes de structure des ligases plutôt que sur les niveaux de résistance aux glycopeptides, dans la mesure où les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine des divers types se chevauchent. Le Tableau II regroupe les différents types de résistance aux glycopeptides, médiée par les gènes *van*, identifiés actuellement, avec leurs caractéristiques génétiques (transposon, localisation des gènes), leur type d'expression (inductible ou constitutif), les espèces chez lesquelles ces résistances sont rencontrées [Depardieu & Courvalin, 2005]. Alors que les 6 types de résistance décrits impliquent tous des enzymes aux fonctions similaires, ils peuvent être distingués par la localisation des gènes (chromosomique ou plasmidique), et par le mode de régulation de l'expression de ces gènes. L'impact sur la thérapeutique des divers types de résistance aux glycopeptides est double : diminution de l'activité bactéricide de ces antibiotiques et sélection de mutants plus résistants sous traitement.

- **Type VanA** : C'est le type de résistance aux glycopeptides le plus fréquent, et le seul, jusqu'alors, à avoir été décrit chez *S. aureus*. La vancomycine et la teicoplanine sont inactives, et la synergie avec la gentamicine est abolie. L'opéron *vanA* est porté par un transposon, Tn1546, détecté au départ sur le plasmide pIP816 chez la souche *E. faecium* BM4147, proche des transposons de la famille Tn3 [Arthur et al., 1993].
- **Type VanB** : cette résistance entraîne une diminution de l'activité de la vancomycine ainsi qu'une perte de la synergie avec la gentamicine et la streptomycine. La teicoplanine seule, conserve son activité, mais, en monothérapie, sélectionne des mutants plus résistants aux deux glycopeptides. L'organisation et les fonctions de l'opéron *vanB* sont similaires à celles de

l'opéron *vanA*, mais diffère au niveau de la régulation, puisque seule la vancomycine est inductrice.

- **Type VanC** : les entérocoques appartenant aux espèces *E. gallinarum* (*vanC1*), *E. casseliflavus* (*vanC2*) et *E. flavescens* (*vanC3*) expriment une résistance intrinsèque à la vancomycine, constitutive ou inductible, tout en conservant une sensibilité à la teicoplanine. L'opéron *vanC* est chromosomique, non transférable. Cette résistance n'a de conséquence sur l'activité des glycopeptides que lorsqu'ils sont utilisés à doses sub-optimales.
- **Type VanD** : l'organisation de l'opéron *vanD*, localisé exclusivement au niveau chromosomique chez les souches actuellement décrites, est similaire à celle des opérons *vanA* et *vanB*. Cette résistance constitutive n'est pas transférable par conjugaison à d'autres entérocoques [Depardieu et al., 2003a]. Cette résistance supprime l'activité de la vancomycine et de la teicoplanine *in vivo* alors que la bactérie apparaît sensible *in vitro*, et les deux antibiotiques sélectionnent des mutants hautement résistants aux glycopeptides. Cela peut s'expliquer par une activité D,D-dipeptidase négligeable. Ainsi, l'enzyme VanX_D est présente mais la bactérie est incapable d'éliminer efficacement les précurseurs DA_{Ala}-DA_{Ala} du peptidoglycane, entraînant un phénotype apparemment sensible aux glycopeptides [Depardieu et al., 2003a]. Cependant, chez de nombreuses souches porteuses de l'opéron *vanD*, la voie normale de synthèse des pentapeptides ne fonctionne pas, cela à cause d'une Ddl ligase rendue inactive par différentes mutations du gène chromosomique *ddl*. En conséquence, les bactéries ne peuvent croître qu'en présence de vancomycine, et l'activité de VanX_D n'est pas indispensable. Une autre particularité du phénotype VanD est la D,D-carboxypeptidase VanY_D qui appartient à la famille des PLP à site catalytique sérine, sensibles aux benzylpénicillines. C'est en cela qu'elle se distingue de VanY ou de VanY_B, qui sont des carboxypeptidases Zn²⁺ dépendantes, insensibles à l'action des pénicillines [Depardieu & Courvalin, 2005]. Les

souches *vanD* + sont donc un formidable exemple d'association de gènes intrinsèques et de acquis afin d'obtenir un haut niveau de résistance aux antibiotiques.

- **Type VanE** : le phénotype VanE correspond à une résistance à bas niveau à la vancomycine, et une sensibilité à la teicoplanine, due à une synthèse inductible de précurseurs du peptidoglycane terminé par DAla-DSer. L'organisation de l'opéron *vanE* est très proche de celle de l'opéron *vanC* : on retrouve les gènes codant une ligase VanE, une dipeptidase/carboxypeptidase VanXY_E et une racémase VanT_E. [Reynolds & Courvalin, 2005].
- **Type VanG** : la résistance de type VanG présente le même phénotype que VanE, et des souches *vanG* ont déjà été décrites responsables d'infections nosocomiales [Boyd et al., 2006].

☐ Cas particulier de la dépendance à la vancomycine

Un phénomène intrigant, ayant une certaine importance clinique, s'est développé chez certaines souches VanA ou VanB, il s'agit de la dépendance à la vancomycine. **Ces isolats ne sont pas simplement résistants aux glycopeptides, mais la présence de ces antibiotiques est nécessaire à leur croissance.** Ils ont été isolés *in vitro*, sur des modèles animaux, mais aussi chez des patients traités par la vancomycine au long cours. La présence de vancomycine induit la synthèse de précurseurs pentadepsipeptidiques DAla-DLac, ce qui permet de pallier l'absence de précurseurs DAla-DAla liée à un déficit fonctionnel de la ligase Ddl. Ces souches nécessitant des conditions particulières de développement, elles sont probablement sous-estimées, car non détectées par les techniques de routine de laboratoire. Une réversion de la dépendance à la vancomycine a déjà été observée, liée à des mutations ponctuelles au niveau du sensor VanS ou au niveau du gène codant la ligase Ddl [Courvalin, 2006].

Tableau II : Caractéristiques des résistances aux glycopeptides chez les entérocoques (modifié d'après [Courvalin, 2006]).

Résistance	Acquise				Intrinsèque		
Niveau	Haut	Variable	Modéré	Bas		Bas	
Type	VanA	VanB	VanD	VanG	VanE	Van C1	Van C2/C3
Transfert par Conjugaison	+	+	-	+	-	-	-
Transposon	Tn1546	Tn1548					
		Tn1549					
		Tn5382					
Localisation des gènes de résistance	Plasmide	Plasmide	Chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome
Expression	Inductible	Inductible	Constitutive	Inductible	Inductible Constitutive	Constitutive Inductible	Constitutive Inductible
CMI (mg/L) Vancomycine	64-1000	4-1000	64-128	16	8-32	2-32	2-32
CMI (mg/L) Teicoplanine	16-512	0,5-1	4-64	0,5	0,5	0,5-1	0,5-1
Espèces bactériennes	<i>E. faecium</i>						
	<i>E. faecalis</i>						
	<i>E. gallinarum</i>						
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>
	<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>				<i>E. flavescens</i>
	<i>E. durans</i>						
	<i>E. mundii</i>						
	<i>E. raffinosus</i>						
Précurseurs terminés par	DAIa - DLac					DAIa - DSer	

1.4.2.2. Gènes *van* chez les staphylocoques : l'inquiétude

Les gènes *van* ont aussi été retrouvés beaucoup plus récemment chez des souches de *S. aureus* de haut niveau de résistance aux glycopeptides, appelées **VRSA** (Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*) [Chang et al., 2003 ; Kacica et al., 2004 ; Tenover et al., 2004]. Jusqu'à présent, 7 cas de VRSA ont été rapportés, uniquement aux Etats-Unis. Il est important de noter qu'aucun lien épidémiologique n'a pu être trouvé entre ces patients, et que chaque cas est considéré comme un développement *de novo* d'une résistance. Ces souches ont généralement été isolées dans des cas de co-colonisation avec des ERG (*E. faecalis vanA*). L'étude menée par Furano *et al.* dans les USI aux Etats Unis entre le 1^{er} janvier 2002 et le 31 décembre 2003, sur 2440 patients, a montré une prévalence de 2,7% de co-colonisation par des SARM et des ERG. Les facteurs de risque étaient l'âge, le sexe masculin, une hospitalisation antérieure en USI, et un traitement antibiotique durant l'année précédente. Parmi les patients co-colonisés, 21% avaient reçu un traitement par vancomycine, 26% par pipéracilline et 17% par fluoroquinolones. Cette co-colonisation ne semble pas liée à une augmentation de la morbi-mortalité (différence non significative par comparaison aux patients non colonisés) [Furano et al., 2005]. Une étude plus récente de Warren et al., dans les USI d'un grand centre hospitalier, a montré une prévalence de 9,5% de co-colonisation ou co-infection par des SARM et des ERG [Warren et al., 2004]. Cette prévalence semble moins importante dans les petits hôpitaux ruraux : 0,29% des patients SARM+ ont été retrouvés co-colonisés ou co-infectés par un ERG, contre 3,8% de co-colonisation SARM chez les patients porteurs d'ERG [McDonald et al., 2004].

Comment s'est faite la transmission des gènes *van* aux staphylocoques ?

La souche VRSA isolée dans le Michigan portait les mêmes séquences *vanA* qu'une souche de *E. faecalis* isolée chez ce même patient. Alors que la souche VRSA isolée en Pennsylvanie avait une séquence différente, avec une CMI plus basse à la vancomycine (question était posée d'une éventuelle instabilité du plasmide) [Weigel et al., 2003]. Ainsi, Flannagan et al. ont montré, en 2003, qu'une souche d'*E. faecalis* résistante à la vancomycine, co-isolée avec une souche de VRSA porteuse des

gènes *vanA*, contenait deux plasmides, dont l'un, pAM830, est un plasmide conjugatif, proche de la famille Inc18, contenant les gènes de résistance à la vancomycine (Tn1546) et à l'érythromycine. La souche de VRSA portait le même plasmide, pAM829 (codant la résistance à oxacilline, gentamicine, kanamycine, érythromycine, rifampicine), que d'autres souches de SARM isolées chez ce patient, mais contenant en plus les gènes *vanA*. Aucune homologie n'a été retrouvée entre les plasmides des souches ERG et VRSA, laissant ouverte la question sur l'origine du transfert du déterminant *vanA* au SARM [Flannagan et al., 2003].

Une pression de sélection par la vancomycine ne semble pas nécessaire au transfert de la résistance ; ainsi, certains patients porteurs de VRSA n'ont pas reçu de traitement par glycopeptides dans les 5 années précédant l'isolement de la souche [Whitener et al., 2004]...

Antagonisme de l'expression des gènes *mecA* et *vanA*.

Severin et al. se sont aussi penchés sur la nature de ces souches multirésistantes, en étudiant une souche clinique de VRSA, HIP11714, porteuse des gènes *mecA* et *vanA*, isolée chez un patient dialysé (Détroit, Michigan) au niveau d'une plaie de pied diabétique et d'un cathéter, co-colonisé par une souche de *E. faecalis* résistant à la vancomycine [Severin et al., 2004]. Par étude de la composition du peptidoglycane par CLHP, ils ont montré l'apparition de 20 nouveaux mucopeptides, avec comme principales modifications, le remplacement total des pentapeptides par des tétrapeptides, et un déficit ou absence de branchements pentaglycine, uniquement en présence de vancomycine dans le milieu de culture. De façon surprenante, ils ont montré un effet antagoniste des deux mécanismes de résistance : en présence de vancomycine et d'une faible dose d'oxacilline dans le milieu, la CMI était restaurée à 12 mg/L pour la vancomycine contre 512 mg/L, et inversement. Cela trouve une explication très simple. En présence d'une faible dose d'oxacilline, seule la PLP2A, PLP de faible affinité, reste active, et elle est incapable d'utiliser les précurseurs pentadepsipeptidiques issus de l'expression des gènes *van*. Ce phénomène a déjà été décrit chez les entérocoques avec la PLP5. Le phénomène inverse est explicable de la même façon : en présence d'une faible dose de vancomycine, il y a production de

pentadepsipeptides, substrats inadéquates pour la PLP2A exprimée en présence d'oxacilline [Severin et al., 2004].

Ce possible transfert de gènes *van* des entérocoques aux staphylocoques crée une réelle inquiétude : le transfert pourrait être plus facile entre une souche de VRSA et d'autres souches de SARM, les staphylocoques sont bien plus fréquemment isolés en clinique et responsables d'infections graves... Cela risque d'entraîner l'émergence et la dissémination de souches résistantes à quasiment tous les antibiotiques, aussi bien en milieu hospitalier que dans la communauté... Que faire si le transfert des gènes *van* a lieu d'une souche VRSA à une souche SARM porteuse de la leucocidine de Pantone Valentine ?

1.4.2.3. Autres mécanismes de résistance aux glycopeptides ?

Des études, menées lors du développement de la vancomycine en 1956, avaient montré que la sélection *in vitro* de mutants de staphylocoques résistants à cet antibiotique était difficile. En 1987 a été rapportée la 1^{ère} souche de *S. haemolyticus* intermédiaire à la vancomycine (CMI 8 mg/L) et résistante à la teicoplanine, ainsi que la 1^{ère} souche clinique de *S. aureus* intermédiaire à la teicoplanine. Ces observations sont restées anecdotiques jusqu'au milieu des années 90 où ont été rapportées des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides, isolées dans de nombreux pays, mais qui demeuraient cependant rares [Smith et al., 1999].

Le terme de **VISA** (Vancomycin Intermediate *S. aureus*) a été le 1^{er} utilisé car les souches, ainsi nommées puisque de résistance intermédiaire à la vancomycine, avaient été isolées dans des pays où seule la vancomycine est utilisée (Japon, Etats Unis). Le terme de **GISA** (Glycopeptide Intermediate *S. aureus*) a été ensuite introduit pour tenir compte de la résistance croisée avec la teicoplanine.

On parle aussi d'**hétéro-VISA**, la définition de ces souches ne reposant pas sur une catégorisation clinique. En effet, ce terme a été introduit par Hiramatsu et al. pour définir les souches de *S. aureus*

sensibles à la vancomycine (CMI 2-4 mg/L), initialement isolées au Japon, mais présentant des sous-populations intermédiaires à la vancomycine (CMI 6-8 mg/L) [Hiramatsu et al., 1997a ; Hiramatsu et al., 1997b]. La définition des hétéro-VISA manque de précision et souffre de l'absence de technique de référence, leur signification clinique restant encore discutée.

☐ Mécanisme de la résistance

Les souches de phénotype VISA/GISA apparaissent être des mutants qui accumulent plusieurs facteurs impliqués dans la résistance aux glycopeptides. Aucun gène de type *van* n'a jamais été identifié chez ce type de souche. Depuis la découverte de la souche Mu50 (VISA), de nombreuses équipes se sont penchées sur le mécanisme de résistance aux glycopeptides de cet isolat, en particulier l'équipe de Cui et al. Ils ont étudié la souche Mu50, et son précurseur présumé, la souche Mu3, afin d'identifier les diverses modifications de la paroi. Ils ont observé une augmentation de l'incorporation de GlcNAc dans la paroi Mu50, une augmentation du pool cytoplasmique de précurseurs monomériques de la muréine (UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide), et une augmentation de l'autolyse avec augmentation du renouvellement du peptidoglycane (augmentation du relargage de GlcNAc, augmentation de l'activité des PLP2 et PLP2'). Par comparaison avec la souche Mu3, Mu50 possède une paroi 2 fois plus épaisse et un taux beaucoup plus important de mucopeptides non aminés [Cui et al., 2000 ; Cui et al., 2003 ; Cui et al., 2006].

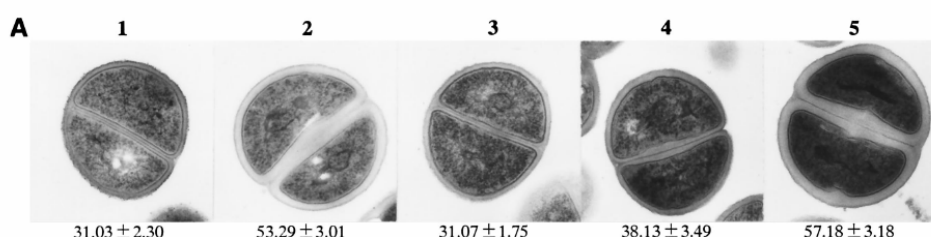


Figure 17 : Images obtenues par microscopie électronique de la souche Mu50 (variation de l'épaisseur de la paroi en fonction de la composition du milieu) d'après [Cui et al., 2000].

Cette équipe a ainsi montré :

- (i) **que la résistance à la vancomycine dépend de la composition du milieu** : plus le milieu est riche en acides aminés et en glucose, plus la résistance est importante. La paroi est d'autant plus épaisse que le milieu est riche en glucose et en L-glutamine (Figure 17).
- (ii) **une accélération de la synthèse du peptidoglycane**, avec augmentation de la consommation de GlcNAc (incorporation sous forme UDP-GlcNAc), et une augmentation de l'activité de l'enzyme GlmS (voie d'Embden Meyerhof, elle convertit Fru-6-P en Glc-6-P). Ceci s'accompagne d'**une augmentation de la proportion en muropeptides non aminés** par consommation de la glutamine par GlmS [Cui et al., 2000].
- (iii) un rôle très important de l'**augmentation de l'épaisseur** de la paroi dans la résistance à la vancomycine. Les glycopeptides sont capturés au niveau des couches périphériques de la paroi et ne peuvent atteindre leur cible. Plus la paroi est épaisse, plus la consommation de glycopeptides est importante. Ils ont ainsi calculé qu'**une bactérie Mu50 était capable de « consommer » $0,6.10^7$ molécules de vancomycine !** [Cui et al., 2000].

La paroi d'une souche de *S. aureus*, sensible aux glycopeptides, est normalement constituée d'une vingtaine de couches de peptidoglycane. La souche Mu50 en possède 30 à 40 ; seules les 10 premières semblent impliquées dans le piégeage de la vancomycine (expliquant une consommation pas plus importante que chez les autres souches). La souche Mu3 se situe entre une bactérie sensible à la vancomycine et Mu50.

- (iv) **la résistance à la vancomycine est proportionnelle à la quantité de muropeptides non aminés**, présentant une affinité supérieure aux autres résidus. Les molécules de vancomycine sont piégées par diminution du nombre de liaisons intermoléculaires. Cela

n'est cependant pas suffisant pour expliquer la résistance, elle nécessite aussi une augmentation de l'épaisseur de la paroi [Cui et al., 2000].

Ces changements morphologiques de la paroi seraient dus à une accumulation de mutations, altérant l'expression de divers gènes : PLP2, PLPD, sigB, ddh... Différents groupes de gènes responsables d'une régulation positive ou négative, ont aussi été rapportés associés à la résistance à la vancomycine, sans qu'aucune mutation particulière n'ait été retrouvée chez toutes les souches VISA.

Les souches de VISA représentent donc une nouvelle stratégie de résistance, très différente des mécanismes de résistance déjà décrits. On parle de « **clogging/trapping effect** » ou piégeage des glycopeptides, associé à une augmentation de l'épaisseur de la paroi. Cela crée un retard suffisant de la saturation de la membrane cytoplasmique par les glycopeptide, permettant à la bactérie de se multiplier et de se diviser avec une disparition de l'effet bactéricide des glycopeptides [Cui et al., 2006].

1.5. Gestion des épidémies à ERG

1.5.1. Origine des souches d'ERG et des épidémies

Les profils épidémiologiques sont variables selon les pays. En Europe, l'origine de la résistance serait liée à un usage extensif de l'avoparcine, alors qu'aux Etats Unis l'utilisation abusive de vancomycine, C₃G, fluoroquinolones ou antibiotiques anti-anaérobies serait incriminée dans la sélection d'entérocoques naturellement résistants, favorisant la colonisation du tube digestif par ces souches. C'est ce que nous allons explorer dans ce paragraphe.

◎ Réservoir n°1 : les patients colonisés ou infectés

La plupart des épidémies sont dues à la **dissémination d'un seul et unique clone**. Le 1^{er} réservoir est représenté par les **patients colonisés et infectés**, la dissémination se réalisant par transmission inter-

patient (chambres à plusieurs lits) ou manuportée par le personnel soignant. Une étude prospective longitudinale chez des patients ventilés en USI a ainsi rapporté une transmission croisée dans 85% des cas, chez des patients initialement non porteurs [Bonten et al., 1996]. La prévalence de colonisation intestinale par des ERG varie selon les études : 2% aux Pays-Bas [Endtz et al., 1997], 3,5% en Belgique [Gordts et al., 1995] et jusqu'à 30,5% en Grèce (mais ils tiennent compte des *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*, naturellement résistants aux glycopeptides) [Metallidis et al., 2006], études menées essentiellement dans des services de réanimation ou de chirurgie.

Le principal problème posé est la durée pendant laquelle les patients restent colonisés. Une étude de Green et al. a montré que plus de 60% des transplantés hépatiques porteurs d'ERG le restent pendant plus de 12 semaines [Green et al., 1991]. Dans l'étude de Livornese et al., la majorité des patients sont restés porteurs pendant plus de 3 mois [Livornese et al., 1992].

Dans la majorité des cas, une association temporelle et spatiale peut être notée entre les patients porteurs. Le contact de patients à risque avec les mains de personnel soignant contaminées a été montrée comme un élément déterminant de la dissémination des ERG. Ainsi, certains auteurs ont montré une prévalence de manuportage chez le personnel soignant de 0 à 41% (!), variable selon les hôpitaux et les services [Boyce et al., 1995 ; Tornieporth et al., 1996].

☉ Réservoir n°2 : l'environnement hospitalier

Des réservoirs potentiels ont aussi été identifiés dans l'environnement hospitalier, sur les surfaces ou même l'équipement médical [Ray, 2002 ; Chavers et al., 2003]. Comme nous l'avons noté plus haut, les entérocoques sont des bactéries particulièrement résistantes aux agents désinfectants, à la température et autres conditions difficiles. Et des techniques inappropriées de désinfection et de nettoyage des chambres, ainsi qu'une mauvaise compliance à l'hygiène des mains sont généralement les 1^{ères} causes de dissémination des ERG en milieu hospitalier. Une étude a montré qu'une contamination environnementale antérieure de la chambre est hautement prédictif d'une acquisition d'ERG, soulignant l'intérêt d'une décontamination efficace suite à l'hébergement de patients porteurs [Drees et al., 2008]. Des audits de surveillance menés dans certains hôpitaux où sévissaient des

épidémies ont documenté une contamination par des ERG au niveau de : gants, blouses, portes, salle de bain, tables, téléphone, lits, glucomètres, moniteurs d'ECG, thermomètres, tensiomètre [Noskin et al., 1995 ; Morris et al., 1995]... D'autres études ont montré une compliance relativement médiocre aux méthodes d'hygiène des mains (port de gants, utilisation de solutions hydro-alcooliques). Ainsi, Pittet et al. ont indiqué que seulement 48% du personnel soignant avaient des pratiques appropriées (!) [Pittet et al., 1999].

☉ Réservoir n°3 : les élevages d'animaux

Cependant, des **réservoirs extra-hospitaliers** ont aussi été identifiés par l'intermédiaire de patients colonisés n'ayant jamais été hospitalisés [Guérin et al., 1998]. La recherche de la source de colonisation a montré un contact avec des animaux porteurs dans des élevages fermiers. Une étude de l'AFSSA en 1999, réalisée sur des échantillons de selles de poulets français, retrouvait 5,4% d'ERG [Petsaris et al., 2005]. Cette étude a été répétée annuellement et la proportion de souches résistantes observée est stable, voire en légère diminution.

La responsabilité en incombe à l'usage abusif de l'avoparcine comme additif alimentaire, en particulier dans les élevages de volailles, en Europe, jusqu'en 1997, date de son interdiction [Bates et al., 1993]. Des souches d'*E. faecium* présentant une sensibilité diminuée à l'avoparcine ont été isolées, et une résistance à la vancomycine a pu être mise en évidence [Chadwick et al., 1996 ; Donnelly et al., 1996 ; Acar et al., 2000]. Une étude réalisée chez des chevaux et des porcs a montré que 7 à 16% des souches étaient porteuses des gènes *vanA*, avec de petites différences au niveau du profil de résistance aux antibiotiques, avec une grande homologie entre les plasmides retrouvés chez les souches animales et humaines [De Niederhäusern et al., 2007]. Plus récemment, une étude menée chez des volailles saines, en Hongrie a révélé une diminution de l'isolement de souches d'entérocoques porteuses de gènes *van* en 2003-2004. Ainsi, 8,6% des souches étaient porteuses des gènes *vanA* en 2001 (*E. mundtii*, *E. durans*, *E. faecium*), contre 23% en 2002 (*E. durans*, *E. faecium*). Aucune souche d'ERG n'a été isolée en 2003-2004 [Ghidan et al., 2008]. Les données annuelles recueillies ont établi une corrélation entre l'isolement d'ERG et l'utilisation d'avoparcine dans les élevages. Cette étude

souligne que la réduction de l'usage des antibiotiques dans les élevages peut permettre de réduire le taux d'ERG, voire même de faire disparaître ces souches 5 ans après l'interdiction de l'usage de l'avoparcine [Ghidan et al., 2008].

L'hypothèse d'un possible passage à l'homme via la chaîne alimentaire a été émise : soit par colonisation directe du tractus intestinal de l'hôte, soit par transfert des gènes de résistance aux bactéries de la flore commensale. Cela a conduit, en janvier 2006, à l'interdiction de l'usage de tout antibiotique en alimentation animale ou comme facteur de croissance dans les élevages [De Niederhäusern et al., 2007].

Ainsi, l'épidémiologie des ERG, en Europe, semble différente de celle des Etats Unis avec des épidémies hospitalières qui restent localisées et rares, et l'existence d'un portage fécal sain communautaire, d'ERG probablement transmis par la chaîne alimentaire. Cela est confirmé par le fait qu'aux Etats Unis, aucun isolat d'ERG n'a pu être isolé de volontaires communautaires ou de patients admis pour la 1^{ère} fois en hospitalisation [Coque et al., 1996]. L'émergence des ERG serait plutôt liée à un usage excessif de la vancomycine en USI. Ces différences d'origine sont renforcées par le fait qu'une très grande divergence existe dans les profils PFGE retrouvés en Europe et aux Etats Unis [Bischoff et al., 1999].

Cependant, une étude récente, menée sur les eaux usées récupérées à la sortie d'une industrie agro-alimentaire au Texas, a montré l'existence de souches d'ERG, multi-résistantes aux antibiotiques (ciprofloxacine, érythromycine, lincomycine, kanamycine, gentamicine, streptomycine). Certaines souches étaient résistantes ou intermédiaires au linézolide ou à la quinupristine-dalfopristine [Beier et al., 2008]. Une étude iranienne va dans le même sens, et montre l'existence d'un lien épidémiologique entre des souches d'ERG isolées d'eaux usées et des isolats cliniques humains [Talebi et al., 2008].

Ces études laissent ouverte la question sur les réservoirs d'ERG, mais aussi et surtout sur l'intérêt éventuel des ERG comme nouveau marqueur de contamination fécale, et de respect des procédures élémentaires d'hygiène...

1.5.2. Facteurs de risque d'acquisition d'ERG

Les facteurs de risque de colonisation ou d'infection à ERG ont été largement analysés [Sakka et al., 2008] et incluent :

- une hospitalisation > 15 j, et hospitalisations multiples,
- l'administration prolongée d'antibiotiques (vancomycine, céphalosporines, imipénème, anti-anaérobies) [Rice et al., 2004 ; De Bruin et al., 2007 ; Paterson et al., 2008],
- âge avancé [Zhou et al., 2008],
- une maladie sévère sous-jacente,
- une insuffisance rénale (créatininémie et urémie élevées),
- une dénutrition (albuminémie très diminuée),
- des interventions instrumentales invasives (cathéter central, sonde urinaire) [Zhou et al., 2008].

La transmission est largement facilitée par la diarrhée, l'incontinence fécale et les suppurations. Beaucoup de ces facteurs de risque sont communs à d'autres BMR telles que les SARM, les Entérobactéries productrices de BLSE (β -Lactamase à Spectre Etendu), ou *Clostridium difficile*.

Pour les ERG, la pression de sélection résultant de la prescription de nombreuses et diverses antibiothérapies, en particulier chez le neutropénique, semble jouer un rôle primordial. Différents antibiotiques peuvent être responsables de la sélection des ERG, en particulier les C₃G et les antibiotiques anti-anaérobies tels que les 5-nitro-imidazolés [Donskey et al., 2000]. Les patients d'onco-hématologie [Montecalvo et al., 1994] constituent donc une population particulièrement sensible aux infections à ERG, ainsi que les transplantés (ou tout autre intervention chirurgicale majeure, en particulier au niveau du thorax et de l'abdomen), les patients dialysés chroniques [Freitas et al., 2006], et les patients hospitalisés en réanimation [Ostrowsky et al., 1999]. En effet, la plupart des thérapeutiques utilisées conduisent à une situation d'immunodépression associée à des lésions muqueuses (mucite, délabrement de la muqueuse intestinale). De plus, l'utilisation d'antibiotiques à

large spectre, C₃G ou fluoroquinolones, inefficaces sur les entérocoques, et associée fréquemment à la vancomycine, entraînent une importante pression de sélection.

1.5.3. Des effets délétères pour les patients ?

Les infections ou colonisations à ERG conduisent à un nombre important d'effets délétères pour les patients hospitalisés porteurs. Les infections urinaires et les infections du site opératoire, après exérèse des tumeurs, sont les plus fréquemment rencontrées [Freney et al., 2007]. Des études ont démontré que les ERG peuvent entraîner des infections graves, et la mortalité attribuable aux bactériémies à ERG est très importante. L'incidence et la gravité des bactériémies à ERG chez les patients d'onco-hématologie ou neutropéniques varient selon la pathologie sous-jacente et les séries publiées, avec des taux de mortalité atteignant 30 à 60% [Vergis et al., 2001 ; DiazGranados et al., 2005 ; Yoo et al., 2005]. Dans un enquête rétrospective récente, réalisée sur 217 adultes recevant une greffe de moelle osseuse allogénique, Zirakzadeh et al. ont montré une multiplication par 2 de la mortalité chez les patients colonisés par un ERG avant transplantation. Cette augmentation était corrélée à au moins un épisode de bactériémie à ERG [Zirakzadeh et al., 2008]. Une autre étude a montré que parmi 768 patients colonisés par un ERG, 4% avaient développé une bactériémie avec la même souche, et que les facteurs de risque de survenue d'une bactériémie sont : une hospitalisation prolongée, une infection d'un autre site (en dehors de la colonisation) et l'administration de vancomycine [Olivier et al., 2008]. Les facteurs de risque de mortalité répertoriés étaient l'immunodépression et la survenue d'une bactériémie à ERG [Olivier et al., 2008]. Cependant, l'existence de nombreuses co-morbidités, chez des patients fragiles, ne permet pas de conclure à la réelle causalité ERG/mortalité, mais semble plutôt être l'accumulation de différents facteurs.

Par ailleurs, la mise en place de mesures de prévention et de contrôle des épidémies à ERG peut aboutir à une réduction de la qualité des soins et de vie des patients : les procédures d'isolement limitent les échanges sociaux, augmentent la durée d'hospitalisation. Le statut « patient ERG+ » rend l'intégration des patients plus difficile, en particulier en service de réadaptation ou de long séjour

[Duerden et al., 1997 ; Lai et al., 1997]. Au sein même des secteurs de cohorting, il est parfois difficile de faire intervenir des spécialistes (radiologues, cardiologues, néphrologues), et la réalisation d'examens simples (radiographie, scanner, soins dentaires) devient un combat de chaque jour pour leur obtention. Cela se traduit par une perte de chance et une diminution de la qualité de vie, parfois importante pour les patients ERG+. Cela peut aboutir à une lassitude du personnel soignant dédié à ces secteurs, et par la même à une diminution de la qualité des soins.

De plus, les problèmes liés au traitement et à l'isolement des patients colonisés et infectés entraîne une majoration des coûts d'hospitalisation, une réorganisation des services, ou même d'un établissement de soins, et la mise en place d'équipes dédiées.

1.5.4. Traitement des infections à ERG... et que donner comme antibiotique à un patient colonisé par un ERG ?

Les options thérapeutiques des infections à ERG sont limitées puisque ces pathogènes sont fréquemment résistants à la plupart des antibiotiques actuellement disponibles. De nouvelles molécules antibactériennes sont aujourd'hui disponibles : quinupristine-dalfopristine, linézolide et daptomycine. Cependant, pour chacun de ces antibiotiques récemment introduits, des souches résistantes ont déjà été décrites [Hershberger et al., 2004 ; Long et al., 2005 ; Bonora et al., 2006 ; Schulte et al., 2007]... A noter aussi pour la quinupristine-dalfopristine, une résistance naturelle chez *E. faecalis* (efflux) et l'existence de réservoirs communautaires aux Etats Unis et en Europe, probablement du fait de l'usage excessif d'un analogue, la virginiamycine, comme facteur de croissance dans les élevages (à mettre en parallèle avec l'abus d'usage de l'avoparcine, à l'origine de la dissémination des ERG en Europe) [Acar et al., 2000]. La tigécycline, molécule la plus récente, reste peut être une bonne alternative... Une étude récente très intéressante a été réalisée en Corée où ces nouvelles molécules ne sont que très peu voire non encore utilisées actuellement, les ERG (*E. faecium vanA*) n'ont donc pas encore été soumis à une pression de sélection [Lee et al., 2007]. Les auteurs ont montré la sensibilité des isolats de 1998 à l'ensemble des molécules testées, alors que la

plupart des isolats de 2005 sont résistants (Figure 18). Alors que ces nouveaux agents sont encore peu utilisés, des résistances sont déjà apparues ; ces thérapeutiques ne semblent donc pas très prometteuses en tant qu'alternatives à long terme...

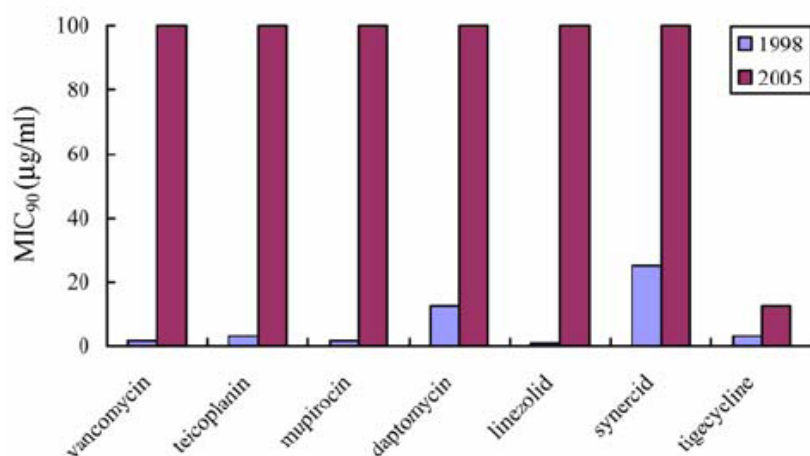


Figure 18 : Valeurs de CMI₉₀ obtenues pour les différents antibiotiques testés, pour les isolats cliniques de *E. faecium vanA* isolés en Corée en 1998 et 2005, (d'après [Lee et al., 2007]).

Plusieurs alternatives ont été proposées pour le traitement des endocardites dues à des souches de *E. faecalis* ou *E. faecium* de phénotype VanA. Les triples associations β -lactamines-gentamicine-vancomycine, ampicilline-ciprofloxacine-vancomycine, ou encore amoxicilline-cotrimoxazole-pristinamycine ont été évaluées *in vitro*, mais les données sur leur efficacité clinique reste encore insuffisantes. Les souches de phénotype VanB ou VanC restent accessibles à la teicoplanine à forte posologie.

Au CHU de Nancy, la Commission Spécialisée des Anti-Infectieux, a établi les recommandations suivantes en novembre 2007 :

- la mise en place d'une politique raisonnée de l'usage des glycopeptides et des C₃G dans tous les établissements concernés par l'épidémie ;
- ne pas traiter les colonisations sans infection par antibiotiques ;

- proposer comme traitement de 1^{ère} intention des rares bactériémies ou infections urinaires symptomatiques à ERG, le linézolide, sous réserve d'un contrôle hématologique bi-hebdomadaire et d'une durée de prescription ne dépassant pas 3 semaines ;
- chez tout patient antérieurement connu comme colonisé, de bien peser toute indication d'antibiothérapie devant une fièvre, et de ne traiter par antibiotique que les infections bactériennes présumées ou documentées ;
- chez tout patient antérieurement connu comme colonisé, justifiant une antibiothérapie, de favoriser l'utilisation des aminopénicillines (amoxicilline ± acide clavulanique), des uréidopénicillines (pipéracilline ± tazobactam), des carboxypénicillines (ticarcilline ± acide clavulanique), et de limiter chez ces patients, l'usage des glycopeptides, C₃G, imidazolés, fluoroquinolones et imipénème.
- chez tout patient antérieurement connu comme colonisé, de contrôler la présence ou non du portage d'ERG au décours de l'antibiothérapie. Si ce patient avait préalablement eu 3 prélèvements négatifs à un mois d'intervalle, le maintien de la négativité à l'issue de l'antibiothérapie serait un élément fort pour le considérer comme probablement « totalement décolonisé ».

▣ Place des probiotiques ?

Les probiotiques contiennent des monocultures ou des cultures mixtes vivantes de microorganismes agissant de façon bénéfique sur l'organisme hôte (animal ou humain) en améliorant les caractéristiques de la microflore qui y réside. Un probiotique idéal doit respecter les conditions suivantes :

- absence de nocivité
- atteindre vivant le site de l'action, s'y multiplier et/ou le coloniser
- donner lieu à des actions cliniquement documentables (modification de la flore intestinale, élimination de germes pathogènes ou opportunistes, stimulation immunitaire...)

- être aisément maîtrisable d'un point de vue technologique (génétiquement stable, pas de transfert de plasmides, production aisée et reproductible, bonne survie dans les denrées alimentaires tout au long de sa conservation).

Les probiotiques les plus utilisés sont les *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. et *Saccharomyces boulardii*. Ils ont déjà montré leur intérêt dans la prévention et le traitement des diarrhées infectieuses [Isakow et al., 2007]. Ils peuvent aider à réduire le déséquilibre bactérien intestinal induit par un traitement antibiotique. Et ils pourraient avoir un impact sur le portage de bactéries multi-résistantes.

Les principaux risques d'utilisation rapportés jusqu'alors sont les risques d'infection généralisée chez les immunodéprimés, le risque d'acquisition de résistance par transfert plasmidique, et le risque de re-colonisation à l'arrêt du traitement.

Une étude australienne randomisée en double aveugle, dans un service de dialyse, a comparé deux yaourts du commerce : un contenant *Lactobacillus rhamnosus* et un autre sans [Manley et al., 2007]. Des coprocultures de contrôle étaient réalisées une fois par semaine, de la 1^{ère} à la 4^{ème} semaine (S1 à S4), puis à la 8^{ème} semaine (S8). Dans le groupe traité, tous les patients étaient ERG négatif à S4, alors que dans le groupe témoin 10 patients sur 11 étaient toujours porteurs. Quatre semaines après l'arrêt du traitement, 3 patients traités étaient redevenus ERG positif. Les patients témoins mis sous traitement de S4 à S8 se sont négativés [Manley et al., 2007]. Ces données semblent montrer une efficacité du traitement probiotique, mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires. Une étude randomisée pilote en double aveugle est actuellement en cours au CHU de Clermont Ferrand et au CHU de Nancy, sur l'administration orale de *Lactobacillus casei rhamnosus*. Les arguments sont pour l'instant insuffisants pour recommander l'usage systématique de probiotiques.

1.5.5. Comment gérer une épidémie ? Quelles recommandations ?

Durant la dernière décennie, différentes approches de prévention et de contrôle de la dissémination des ERG ont été développées et intégrées dans des recommandations nationales. Ces recommandations se sont fondées sur l'origine des ERG, sur le mécanisme de transmission au sein des établissements de soins, et sur les facteurs de risque d'acquisition de ces pathogènes. La gestion d'une épidémie à ERG, ou de toute épidémie, quelle qu'elle soit, passe d'abord par la création d'une équipe pluridisciplinaire, coordonnée, capable de fédérer les personnels impliqués et de maintenir mobilisation et cohésion.

Les mesures préventives afin d'éviter la sélection et la dissémination des ERG comprennent [Bischoff et al., 1999 ; Chavers et al., 2003, Lucet et al., 2007 ; Kurup et al., 2008] :

- le lavage des mains (encore insuffisamment respecté par le personnel soignant), avec l'usage de solutions hydro-alcooliques, correctement employées ;
- l'isolement des patients porteurs (création d'unités de cohorting) ;
- le renforcement des précautions contact (gants, surblouses, matériel dédié) ;
- un dépistage rapide et efficace des patients porteurs, avec utilisation de méthodes adéquates, sensibles, spécifiques, rapides et simples ;
- un système d'alerte rapide, conjointement par le laboratoire de bactériologie et l'EOHH ;
- une nettoyage efficace de l'environnement hospitalier [Eckstein et al., 2007] ;
- l'utilisation d'un pictogramme « ERG » pour le fléchage des patients (avec tout ce que cela peut impliquer comme perte de chances pour le patient, comme explicité ci-dessus) ;
- une information et une éducation du personnel soignant (de l'ensemble de la chaîne de soins : de l'ambulancier au personnel hospitalier, en passant par le médecin traitant), des patients, des familles ;
- un usage raisonné des antibiotiques, en particulier des glycopeptides et des C₃G. En effet, l'administration de vancomycine ou d'autres antibiotiques tels que les C₃G, la clindamycine,

le métronidazole, peut augmenter le taux de colonisation intestinale et cutanée, et majorer ainsi la transmission de patient à patient ;

- ...

N.B. : Petite note plaisante sur ce qu'il est possible d'inventer pour améliorer la compliance aux procédures d'hygiène des mains !

En effet, il est connu et admis que la compliance du personnel soignant aux procédures de lavage des mains est faible, et trop souvent non contrôlée. Venkatesh et al., ont ainsi évalué un système électronique de mesure de la compliance et de suivi de l'impact des procédures de lavage des mains. Chaque entrée et sortie de chambre de patient, dans un service d'hématologie, est enregistrée par un système de vidéo-surveillance ; lorsque le lavage des mains n'est pas effectué spontanément, le personnel est rappelé à l'ordre par 3 bips, un flash lumineux et une voix pré-enregistrée « Please wash your hands ». Ils ont ainsi montré que ce système multiplie par 2 la compliance à l'hygiène des mains, et augmente l'adhésion aux recommandations [Venkatesh et al., 2008]. Il demeure que malgré tout ce système, et le coût qu'il engendre, 30% du personnel soignant ne se lave toujours pas les mains !

La mise en œuvre rapide et stricte de ces mesures a déjà prouvé son efficacité pour juguler les épidémies à ERG. Cela nécessite une veille et une implication de chaque instant, par des équipes pluridisciplinaires, conscientes du problème et des risques. Il demeure que c'est un système lourd à mettre en place, et à poursuivre sur le long terme, et qu'il faut rester vigilant quant à une lassitude des personnes impliquées... Tout manquement à ses règles a déjà montré être la porte ouverte à une recrudescence de ces pathogènes...

EN RESUME

Les glycopeptides sont des « anciennes » molécules, longtemps restées dans les tiroirs du fait de leur néphro- et ototoxicité importantes. Elles ont été redécouvertes lors de l'émergence et de la dissémination des SARM, et ont rendu d'immenses services, en particulier dans les infections sévères à bactéries multirésistantes (BMR). Elles sont depuis quelques années de nouveau pointées du doigt du fait de l'apparition d'une résistance à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, cette résistance étant apparue relativement tardivement après leur commercialisation. Les mécanismes de résistance chez les entérocoques sont très étudiés : les opérons *van* sont maintenant parfaitement élucidés, 6 phénotypes sont identifiés et la recherche se poursuit. Les facteurs de risque d'acquisition de ces nouveaux pathogènes ont été très étudiés, et la survenue d'épidémies dans divers pays et divers types de services (USI, dialyse, onco-hématologie...) a permis de montrer que ces nouveaux pathogènes, essentiellement nosocomiaux, s'attaquent aux patients fragiles, immunodéprimés, fréquemment hospitalisés et ayant subi plusieurs cures d'antibiotiques. Reste la problématique du traitement des infections à ERG, et le risque d'impasse thérapeutique. Les entérocoques se caractérisent en effet par une remarquable adaptabilité, et des résistances ont déjà été signalées à l'encontre des thérapeutiques les plus récentes.

Chapitre II : Rôle du laboratoire de bactériologie dans la détection des résistances bactériennes

L'objectif des analyses de bactériologie clinique est d'aider au diagnostic, au traitement et à la prévention des maladies infectieuses. La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées en clinique et l'étude de l'efficacité des traitements sont deux des tâches essentielles du laboratoire de bactériologie. Au laboratoire, la mesure de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée par méthode automatisée de dilution en milieu liquide ou par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Il existe aussi des méthodes quantitatives permettant de mesurer les CMI et CMB d'un antibiotique vis à vis d'une souche bactérienne. Ces mesures, non réalisées en routine de laboratoire de biologie médicale, sont utiles dans le cas d'infections sévères telles que les endocardites, ou lorsqu'on utilise des antibiotiques dont le seuil de toxicité est proche de la concentration efficace. La technique de référence de détermination des CMI reste la technique de dilution en milieu gélosé, même si la méthode la plus utilisée est celle de macro- ou microdilution en milieu liquide.

L'émergence et la dissémination de bactéries multirésistantes (BMR) ont par ailleurs fait naître des inquiétudes, en particulier en milieu hospitalier. Ainsi, actuellement, certains patients dits « à risque » (chirurgie orthopédique, cardiaque..., ou hospitalisation en unité de soins intensifs) sont dépistés systématiquement à leur entrée au CHUN, à la recherche de BMR. Ce dépistage incombe au laboratoire de bactériologie.

Dans ce chapitre, nous étudierons les principales tâches du laboratoire de bactériologie concernant la réalisation de l'antibiogramme, son interprétation, ainsi que le dépistage particulier de certaines résistances, en centrant le débat sur l'identification et l'étude de la résistance des Entérocoques Résistants aux Glycopeptides (ERG) : détection d'une résistance hétérogène, recherche de gènes de résistance par PCR, typage des souches à la recherche de l'origine et de la clonalité des souches.

2.1. Détermination de la sensibilité *in vitro* : l'antibiogramme

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également : à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et à l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles. Sa réalisation est laissée à l'initiative du biologiste. Il faut garder à l'esprit qu'en pratique, on étudie l'effet des antibiotiques *in vitro* et dans des conditions normalisées de culture. Ainsi, il est indispensable d'établir des relations avec l'activité *in vivo* afin de présumer de l'efficacité *in vivo* de l'antibiotique et donc de la réussite (ou de l'échec) du traitement sur la base de données biologiques *in vitro*. La mesure des CMI des antibiotiques, que ce soit par la technique de micro- ou macro-dilution en milieu liquide ou gélifié, ne peut être effectuée aisément en routine. Des techniques simplifiées ont ainsi été introduites : la diffusion en milieu gélifié et les techniques automatisées, qui seront décrites ci-après.

2.1.1. Méthode de diffusion en milieu gélifié

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélifié ou « méthode des disques », comme elle est plus communément appelée, s'est imposé en routine dans les années 50 sur la base des travaux de Kirby et Bauer, et de Y.A. Chabbert [Courvalin et al., 2006]. Elle est encore largement utilisée aujourd'hui, même si les techniques automatisées l'ont quelque peu supplantée. Cette technique a l'avantage d'être **d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, de fournir des données sur l'interaction des différents antibiotiques entre eux** et enfin d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [Courvalin et al., 2006].

☐ Principe

Des disques de papier imprégnés d'une dose donnée d'un antibiotique sont placés sur la gélose, préalablement ensemencée par la souche à tester (inoculum équivalent à 0,5 McFarland, dilution variable selon la bactérie considérée, ensemencement par inondation). L'antibiotique diffuse depuis le disque dans la gélose, avec un gradient de concentration diminuant du disque vers la périphérie. Après une incubation de 18 h, une mesure des zones d'inhibition de la croissance bactérienne est réalisée autour de chaque disque.

A la limite des zones d'inhibition, la concentration d'antibiotique dans la gélose est égale à la CMI. Une relation simple existe entre le diamètre des zones d'inhibition et les log des CMI mesurées par les techniques de dilution. Ces relations, appelées **droites de concordance** ou droites de régression ont été établies par des laboratoires spécialisés travaillant dans des conditions standardisées. A condition de respecter un protocole identique, ces courbes sont utilisables par les laboratoires de biologie médicale.

Pour certains antibiotiques, cependant, comme les glycopeptides, il n'existe pas de corrélation entre le diamètre d'inhibition et la CMI. Il est donc indispensable, lorsque le diamètre est inférieur au diamètre critique (17 mm), de déterminer les CMI par une méthode de référence ou tout autre méthode équivalente (E-test, Vitek2).

☐ Contrôle de qualité interne

Il doit être régulièrement effectué afin de valider les résultats obtenus (au minimum une fois par mois). Les souches recommandées par le CA-SFM sont les suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Providencia stuartii* CIP 107808, *Streptococcus pneumoniae* CIP 104485 [CA-SFM, 2008].

☐ Limites

Malgré les tentatives de standardisation (souvent incomplètement et insuffisamment respectées) et la mise en place d'un contrôle de qualité, de nombreux écueils demeurent [Courvalin et al., 2006] :

- **Concentration et diffusion à partir du disque** : le gradient de concentration disque-périphérie évolue au cours du temps. Initialement, le disque se décharge très rapidement dans la gélose, la charge d'antibiotique est entièrement concentrée autour du disque et les concentrations s'effondrent très vite dès que l'on s'en éloigne. Progressivement, les concentrations s'abaissent au voisinage du disque pour diffuser à la périphérie. Si l'on attend plusieurs jours, tout gradient a disparu et la concentration est la même dans l'ensemble du milieu gélosé.
- **Déchargement des disques lors de la conservation** : si les disques ne sont pas conservés dans des conditions adéquates, ils peuvent perdre tout ou partie de leur charge en antibiotique. Dans ce cas, la résistance observée est due uniquement à l'absence d'antibiotique dans la gélose. **Il faut donc être vigilant lors de l'interprétation si plusieurs antibiogrammes réalisés à partir d'un même lot de disques font apparaître une résistance à un même antibiotique.**
- **Inoculum bactérien** : normalisé dans les recommandations des différents comités à 0,5 Mc Farland (lecture de l'absorbance à 550 nm), l'inoculum reste parfois difficile à évaluer, en particulier dans le cas des hémocultures, où la présence des cellules du sang rend difficile son estimation. Un inoculum trop fort se traduira par un épais tapis bactérien et les diamètres d'inhibition peuvent s'en trouver artificiellement diminués (déséquilibre entre le nombre de bactéries et le nombre de molécules d'antibiotiques disponibles).
- **Lecture du diamètre d'inhibition** : la lecture est subjective. Des études ont montré que la lecture peut varier de 2 mm d'un opérateur à un autre ; cette différence de mesure pouvant aboutir à une divergence d'interprétation en catégorisation clinique (S, I ou R).

☐ Un autre système de diffusion en milieu gélosé : les bandelettes E-test

Comme souligné auparavant, il n'existe pas de corrélation entre le diamètre des disques d'inhibition obtenus avec la méthode de diffusion en milieu gélosé, et la CMI. Il est donc indispensable de déterminer la CMI lorsqu'une résistance aux glycopeptides est suspectée, afin de mieux évaluer le phénotype de résistance. Les E-test sont des bandelettes de papier, imprégnées d'un gradient de concentration d'antibiotiques. La procédure de réalisation est la même qu'avec les disques : après dépôt de l'inoculum bactérien (à l'aide d'un écouvillon plutôt que par inondation), la bandelette est disposée sur la gélose. Après 24 h d'incubation à 35°C, la détermination précise de la CMI se fait au niveau du croisement entre la bandelette et l'ellipse d'inhibition. Même si cette technique est plus sensible et plus précise que la méthode classique des disques, elle demeure de lecture difficile pour les non-initiés, et d'un coût important.

La méthode des E-test, même si elle est plus sensible que la méthode classique des disques peut passer à côté de phénotypes de résistance exprimés à bas niveau et inductible. Des écueils ont déjà été soulignés, et des améliorations des techniques ont été investiguées. Ainsi, des auteurs ont montré que la détermination de certains phénotypes Van (VanB2 par exemple), apparaissant sensible à la vancomycine, pouvait être améliorée par l'addition d'Oxgall (bile deshydratée, 10 g/L) dans le milieu gélosé Mueller Hinton [Grabsch et al., 2008].

2.1.2. Antibiogramme automatisé

L'automatisation de l'antibiogramme s'est développée pour pallier aux inconvénients de cette technique manuelle, manquant de standardisation et dont la réalisation est lente. Ces automates utilisent le principe de la culture en milieu liquide. Grâce à divers dispositifs, ces systèmes vont simplifier ou automatiser : l'inoculation, l'incubation avec une étuve intégrée à l'automate, puis la lecture. A partir de la croissance des bactéries, des algorithmes permettent d'approcher les valeurs de

CMI qui sont catégorisées par rapport aux concentrations critiques puis interprétées par une lecture qui tient compte d'une base de données des connaissances actuelles en matière de résistance des bactéries. Une actualisation régulière de ces données est donc nécessaire. Ces automates permettent également une identification bactérienne.

Un des problèmes est la **relative rigidité de ces systèmes** : le dessin des galeries ne peut pas être modifié rapidement. Dans le cas de l'introduction d'une nouvelle molécule, les algorithmes permettant de passer de la lecture automatisée de la croissance bactérienne à des paramètres utilisables par le bactériologiste doivent être validés expérimentalement ce qui peut conduire à des délais très longs. Un autre exemple de délai d'adaptation est la modification des concentrations critiques ; ainsi, il existe toujours au moins un an de décalage entre la publication des nouvelles recommandations du CA-SFM et la mise à jour sur automate. Le problème se pose actuellement avec l'harmonisation européenne des concentrations critiques, réalisée par l'EUCAST, qui va nécessiter une modification pour la plupart des antibiotiques testés en pratique courante.

Le second inconvénient de ces systèmes est l' **absence de détection d'un contaminant**. Certaines contaminations ne sont repérées que sur la réponse aberrante de l'antibiogramme, alors que la méthode des disques permet une détection visuelle très rapide.

Les résistances inductibles sont généralement difficiles à détecter. La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques en est un très bon exemple. Le type VanA, qui confère un haut niveau de résistance à la vancomycine et à la teicoplanine, devrait être, en principe, aisément détectable phénotypiquement. Cependant, cette résistance est lentement inductible, ce qui explique que ce phénotype ne puisse pas toujours être détecté par les systèmes rapides automatisés. Diverses publications ont rapporté la mise en défaut de ces systèmes. Chen et al. ont par exemple montré que le système MicroScan Walk-Away (Becton Dickinson) détecte aisément les résistances *vanA* et *vanB*, mais la résistance de type *vanC* nécessite une confirmation par PCR du fait de leur faible niveau de résistance [Chen et al., 1997].

[illegible]

- caractérisation du phénotype de résistance avec un assortiment judicieux d'antibiotiques

- **liste standard** : antibiotiques nécessaires à l'orientation thérapeutique en fonction des

- L'exemple est donné Figure 19 pour les entérocoques.

Du fait de la multiplicité des résistances acquises ou intrinsèques, l'analyse, en terme de mécanismes biochimiques, des phénotypes de résistance est impossible si l'on ne connaît pas l'identité de la bactérie. De plus, l'importance clinique d'un caractère de résistance donné dépend de la bactérie étudiée. Enfin, les niveaux phénotypiques de résistance dus à un même déterminant peuvent varier considérablement d'une bactérie à l'autre.

74

Liste standard

A

Enterococcus spp.⁶

Liste complémentaire

Enterococcus spp.⁶

Aide à l'identification
d'*Enterococcus faecalis*
= résistance naturelle

Teicoplanine (H)
Vancomycine (H)

30 µg	≤ 4	> 8	≥ 17
30 µg	≤ 4	> 8	≥ 17

B

Du fait d'une expression parfois faible ou tardive de la résistance aux glycopeptides des entérocoques, il est recommandé de déterminer les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine par la méthode de dilution en gélose ou par toute technique ayant démontré, pour ces antibiotiques, son équivalence avec la technique de référence :

– en cas d'échec thérapeutique

– lorsque, par la méthode de diffusion en gélose, après 24 heures d'incubation :

• le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de l'un des deux glycopeptides est < 17 mm

• le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de vancomycine est inférieur d'au moins 3 mm à celui autour du disque de teicoplanine

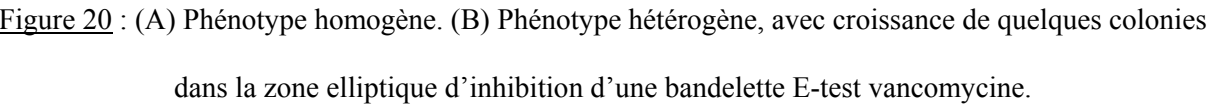
• quelques colonies sont présentes dans la zone d'inhibition de l'un des deux glycopeptides.

– lorsque les souches sont catégorisées I ou R à au moins l'un des deux glycopeptides par les méthodes automatisées.

– en cas de culture sur un milieu additionné de vancomycine

Il convient aussi de vérifier l'identification, notamment en cas d'infection sévère, *Enterococcus casseliflavus* / *flavescens* et *Enterococcus gallinarum* étant naturellement résistants aux glycopeptides.

Figure 19 : (A) Exemples de listes standard et complémentaire. (B) Recommandations concernant vancomycine et teicoplanine chez les *Enterococcus* spp. [CA-SFM, 2008].

[illegible]

77

gènes *vanA*, preuve de l'utilité grandissante des outils de biologie moléculaire pour détecter les gènes *van* et enrayer les épidémies.

L'implication de ces souches de phénotypes VanD et de génotype *vanA* en clinique a été récemment documentée, montrant un échec du traitement par teicoplanine, et soulignant l'intérêt grandissant de l'identification des gènes de résistance [Song et al., 2008].

2.4. Identification et mise en évidence de gènes de résistance : exemple des gènes *van* par PCR multiplex

La résistance aux antibiotiques peut être due à l'acquisition de gènes étrangers ou à des mutations sur des gènes intrinsèques. Différentes stratégies peuvent être mises en œuvre pour les détecter. Pour la détection des gènes de résistance, de nombreuses applications sont basées sur les techniques d'amplification génique par PCR, avec confirmation par détermination de la taille du produit d'amplification en gel d'électrophorèse (parfois par d'autres méthodes : hybridation, polymorphisme de restriction, détermination de séquence). Certains travaux ont développé des PCR multiplex permettant de détecter plusieurs gènes de résistance et d'identifier les bactéries en une seule réaction.

Ainsi, de nombreux établissements de soins ont, aujourd'hui, mis en place des systèmes de surveillance des épidémies d'ERG, impliquant un rôle actif du laboratoire de bactériologie. La plupart utilise des méthodes de détection par culture, qui présentent quelques limitations. Le délai de 1 à 5 jours, notamment, pour le rendu des résultats, affecte l'implantation de mesures efficaces de contrôle de la dissémination des ERG (isolement, cohorting). Par ailleurs, le phénotype VanA ne pose pas particulièrement de problèmes de détection phénotypique car il est responsable d'une résistance à haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. Mais d'autres déterminants, responsables d'une résistance à plus bas niveau, comme *vanB* ou *vanD*, sont plus délicats à détecter, nécessitant la mise en place de techniques PCR. Les techniques d'identification bactérienne (galeries API ou sur automate Vitek2) ne sont pas toujours fiables pour identifier certaines espèces d'entérocoques, notamment *E.*

gallinarum et *E. casseliflavus*. L'utilisation des techniques génotypiques a donc rapidement été étudiée pour l'identification et la détection des gènes *van* chez les entérocoques.

Les méthodes moléculaires basées sur la PCR pour la détection des gènes de résistance aux glycopeptides ont été décrites pour la 1^{ère} fois en 1995 [Dutka-Malen et al., 1995]. Les amorces présentées Tableau III, permettent de détecter à la fois les différents gènes de résistance retrouvés le plus fréquemment (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*) et les gènes spécifiques des ligases de *E. faecalis* et *E. faecium*. Un exemple de gel électrophorétique est présenté Figure 21. Divers auteurs ont ensuite évalué différentes amorces, afin d'améliorer la spécificité de détection [Miele et al., 1995].

Tableau III : Séquence des 1^{ères} amorces décrites pour la recherche des gènes de résistance aux glycopeptides et des gènes de ligase de *E. faecalis* et *E. faecium* (d'après [Dutka-Malen et al., 1995]).

Amplified gene	Size of PCR product (bp)	Oligodeoxynucleotide		Position	GC content (%)
		Pair	Sequence (5' to 3') ^a		
<i>vanA</i>	732	A ₁	+GGGAAAACGACAATTGC	175–191	53
		A ₂	–GTACAATGCGGCCGTTA	907–891	53
<i>vanB</i>	635	B ₁	+ATGGGAAGCCGATAGTC	173–189	53
		B ₂	–GATTTCTGTTCTCGACC	807–791	53
<i>vanC-1</i>	822	C ₁	+GGTATCAAGGAAACCTC	246–272	53
		C ₂	–CTTCGCGCCATCATAGCT	1067–1051	50
<i>vanC-2, vanC-3</i>	439	D ₁	+CTCCTACGATTCTCTTG	455–486	47
		D ₂	–CGAGCAAGACCTTTAAG	885–869	47
<i>ddl_{E. faecalis}</i>	941	E ₁	+ATCAAGTACAGTTAGTCT	98–116	38
		E ₂	–ACGATTCAAAGCTAACTG	1038–1021	39
<i>ddl_{E. faecium}</i>	550	F ₁	+TAGAGACATTGAATATGCC	NA ^b	37
		F ₂	–TCGAATGTGCTACAATC	NA	39

^a +, sense primer; –, antisense primer.

^b NA, not applicable.

De nombreux laboratoires ont récemment introduit ces techniques afin de confirmer la présence d'ERG, et de faciliter l'identification et la mise en évidence des gènes de résistance, y compris chez les entérocoques naturellement résistants aux glycopeptides [Coombs et al., 1999]. Ces méthodes se sont avérées être de bonnes alternatives aux méthodes phénotypiques pour la détection de la résistance aux glycopeptides [Dutka-Malen et al., 1995 ; Fluit et al., 2001].

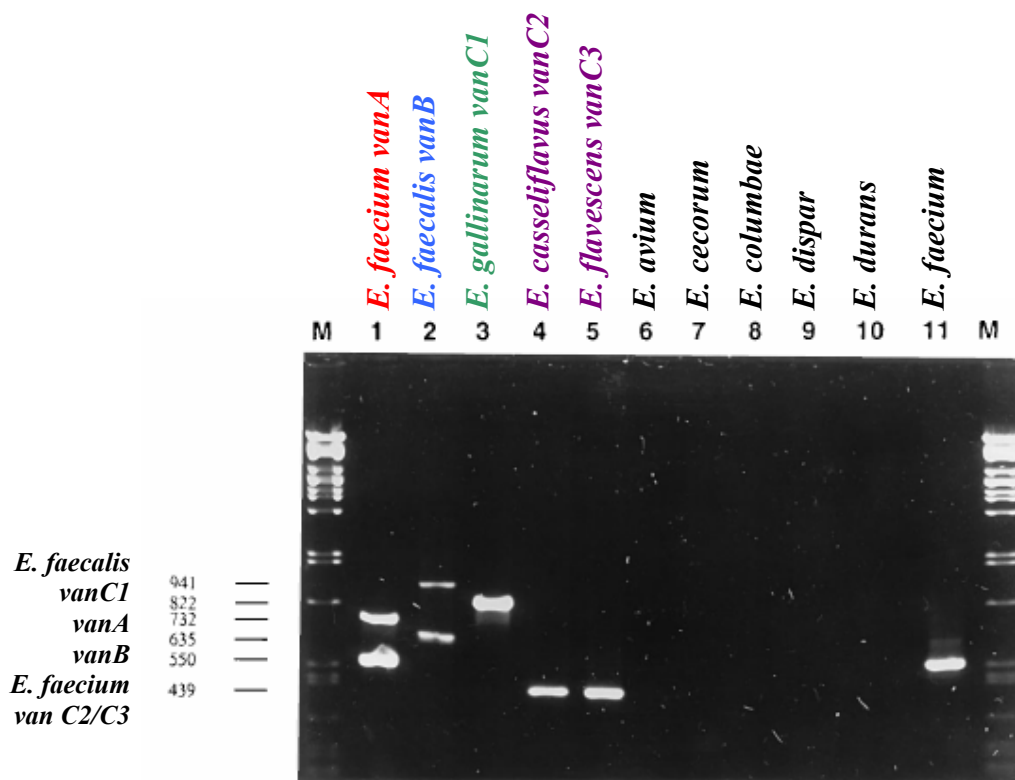


Figure 21 : Analyse par PCR multiplex de différentes souches d'entérocoques sensibles ou résistants aux glycopeptides.

Ces méthodes ont montré de nombreux avantages tels que : la détection de bas niveau de résistance, la distinction des différents génotypes *van*, l'identification conjuguée des bactéries (pour les techniques multiplex), la rapidité... Certains auteurs recommandent la détection des ERG par PCR en routine, du fait qu'elles permettent d'améliorer le délai de rendu des résultats et de réduire le coût de détection, élément indispensable à prendre en compte dans un contexte épidémique [Satake et al., 1997 ; Chen et al., 1998 ; Jayaratne & Rutherford, 1999 ; Roger et al., 1999].

L'application de la PCR pour la détection des ERG directement dans les échantillons à visée diagnostique ou sur les écouvillons rectaux / selles récoltées dans un but de dépistage, ou sur des bouillons d'enrichissement, peut permettre d'optimiser la rapidité de détection. Les études utilisant des méthodes conventionnelles de PCR ont rapporté des degrés divers de sensibilité et une spécificité importante de ces techniques, résultats plutôt encourageants quant à l'utilisation d'une PCR directe à partir d'échantillons.

- Evaluation sur bouillons d'enrichissement : les études ont montré une sensibilité de 85,1 à 97,9%, et une spécificité de 100% [Satake et al., 1997 ; Roger et al., 1999, Lu et al., 2001]. Roger et al. concluent à une meilleure sensibilité et à la rapidité d'un dépistage par PCR, et recommandent cette technique pour la surveillance des patients porteurs.
- Evaluation directement sur échantillons de selles ou écouvillons rectaux : les études ont rapporté une sensibilité moindre, de 67,8 à 87,2%, et une spécificité proche de 100% [Satake et al., 1997 ; Petrich et al., 1999].

Ces observations sont à mettre en parallèle avec celles obtenues lorsqu'on considère les résultats de la culture avec ou sans enrichissement : de même que la culture directe, la PCR directe est moins performante qu'après enrichissement, cela est d'autant plus vrai que les patients porteurs d'ERG sont de faibles excréteurs. Alors utilisation de la PCR oui... mais uniquement en confirmation de la culture ? ou après bouillon d'enrichissement ?

Il est indispensable de faire une évaluation approfondie des différentes étapes de la PCR, afin d'optimiser ses performances. Les selles sont en effet l'échantillon le plus difficile sur lequel réaliser une PCR du fait de la présence d'inhibiteurs de Taq polymérase. La PCR avait ainsi montré au départ une moindre sensibilité par rapport à la méthode classique par culture.

Satake et al. ont montré que l'utilisation d'un seul couple d'amorces *vanA* augmente la sensibilité par comparaison à celle obtenue avec les 4 couples d'amorces *vanA*, *vanB*, *vanCI*, *vanC2/C3*. L'augmentation de la quantité de bouillon d'enrichissement utilisée (4 µL vs. 2 µL) ne joue pas sur les performances de la technique [Satake et al., 1997]. Par contre, ils ont démontré l'importance d'une double étape de purification, à l'aide à la fois d'une colonne QIAamp (Qiagen Inc., Etats Unis) et par le système Centrisep gel filtration (Princeton separation Inc., Etats Unis). Ainsi, avec une seule étape, 3 échantillons auraient été rendus faussement négatifs (Figure 22) [Satake et al., 1997].

D'autres auteurs ont réalisé une association PCR-RFLP (digestion par Msp-I) afin d'augmenter la spécificité, et en supprimant l'étape d'extraction afin d'améliorer le délai de rendu des résultats [Patel et al., 1997].

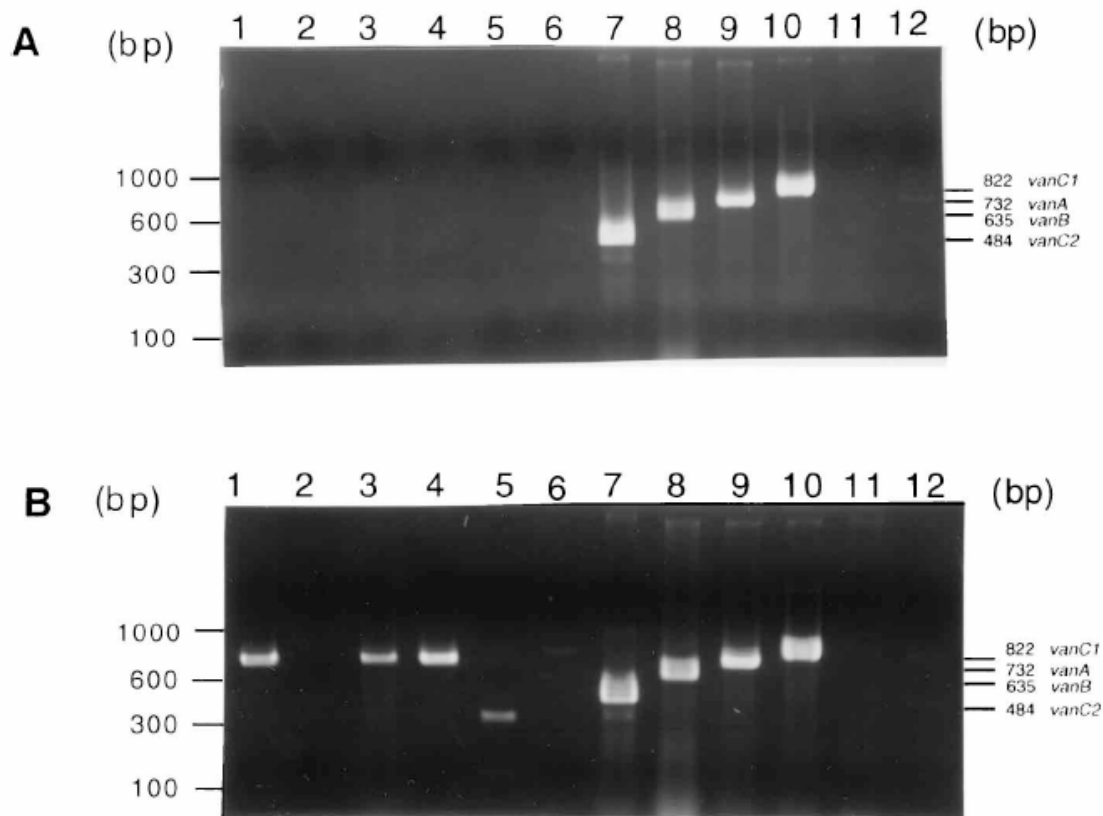


Figure 22 : Comparaison des résultats obtenus par PCR multiplex, après (A) une seule purification, (B) une double purification (d'après [Satake et al., 1997]).

1-6 : échantillons cliniques obtenus par écouvillonnage rectal ; 7 : *E. casseliflavus* ; 8 : *E. faecalis* *vanB* ; 9 : *E. faecium* *vanA* ; 10 : *E. gallinarum* *vanC1* ; 11 : *E. faecalis* ; 12 : témoin négatif.

Plus récemment, la technologie de **PCR en temps réel** a ouvert une nouvelle voie, et offre la possibilité de confirmer la présence d'ERG plus rapidement qu'avec les méthodes de PCR conventionnelle ou qu'avec les méthodes phénotypiques. Palladino et al. ont ainsi évalué la performance d'une technique de PCR temps réel des gènes *vanA* et *vanB*, sur les écouvillons rectaux obtenus d'une cohorte de patients connus ERG+ [Palladino et al., 2003]. Ils ont montré une sensibilité bien meilleure de la PCR TR après enrichissement (88%), que lorsqu'elle est utilisée directement à partir d'écouvillons rectaux (45%) ; ils ont par ailleurs observé une inhibition de la PCR dans 55,1% des cas ! Ils concluent que la PCR TR + enrichissement est une bonne alternative à la culture, car elle permet un rendu des résultats en 24-28 h contre 1 à 5 jours pour la culture, et n'augmente pas le coût

de détection, si l'on prend en considération les tests de confirmation indispensables après isolement d'un ERG sur gélose (12,49 contre 15,41 dollars) [Palladino et al., 2003].

Un kit de PCR TR *vanA/vanB*, BD GeneOhm VanR Assay® (Becton Dickinson, Etats Unis), a récemment été approuvé par la FDA et commercialisé pour la recherche d'ERG dans les écouvillons rectaux, mais pas dans les selles. Stamper et al. ont montré une sensibilité de 96,6% (98,3% sur écouvillons rectaux, 95,4% sur selles) et une spécificité de 87%. Cette faible spécificité est due à de nombreux faux positifs lorsqu'on considère le gène *vanB*. Les auteurs concluent que ce kit est applicable pour la recherche du gène *vanA*, mais que celle du gène *vanB* nécessite des investigations complémentaires [Stamper et al., 2007]. En effet, d'autres espèces de la flore intestinale ont été décrites porteuses des gènes *vanB*. La détection directe de ce cluster de gènes à partir d'écouvillons rectaux, que ce soit avec ou a fortiori sans identification de l'espèce, ne confirme en rien de la présence d'ERG (mauvaise valeur prédictive positive).

Une des techniques les plus récente est celle d'hybridation sur bandelettes (Genotype *Enterococcus*, Hain Lifescience GmbH, Allemagne). Le principe en est simple : après recueil de quelques colonies sur une culture, extraction de l'ADN et amplification par PCR conventionnelle, les amplicons sont hybridés sur une bandelette de nitrocellulose. La révélation est réalisée par addition de PAL/streptavidine, et d'un substrat. Cette technique permet la détection simultanée de cinq espèces d'entérocoques ; *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*, ainsi que des principaux gènes de résistance aux glycopeptides : *vanA*, *vanB*, *vanC1* et *van C2/C3*. Eignier et al. ont montré que cette méthode permet une identification correcte dans 99% des cas et une détection exacte des gènes de résistance dans 100% des cas [Eignier et al., 2005]. Ce système est actuellement en évaluation au sein de notre laboratoire, et fait l'objet du mémoire de fin d'internat de M^{elle} Alice Duroch.

EN RESUME et EN QUESTIONS

L'utilisation de la PCR, conventionnelle ou temps réel, directement à partir d'écouvillons rectaux, pose questions :

- ① Ces techniques ne permettent parfois que la détection des gènes *vanA* et *vanB*, sans identification des souches porteuses. Or des bactéries de la flore intestinale, autres que les entérocoques, ont été décrites porteuses de ces gènes [Ballard et al., 2005]. Cela rend indispensable le couplage de la recherche de gènes de résistance à celle de gènes permettant une identification, ainsi qu'à une technique de culture pour mettre en relation les gènes de résistance et la bactérie porteuse.
- ② Elles n'autorisent pas la conservation des souches, en vue d'investigations complémentaires. Une culture en milieu gélosé doit être réalisée en complément.
- ③ Quelle est la signification clinique des échantillons PCR positive / culture négative ? S'agit-il d'une détection de gènes chez des bactéries non viables ? S'agit-il d'une si faible excrétion qu'elle ne permet pas une croissance en culture ?
- ④ Ces techniques sont l'apanage de quelques laboratoires, ont un coût important et ne sont pas réalisables dans le cadre d'une flambée épidémique avec plusieurs centaines de prélèvements à traiter par jour.

Il apparaît donc indispensable de combiner ces différentes techniques afin d'optimiser le dépistage des ERG, en combinant sensibilité, spécificité, rapidité de détection et conservation des souches.

2.5. Typage des souches : épidémiologie, suivi d'un clone

Les marqueurs épidémiologiques sont les caractères discriminants permettant de distinguer, au sein d'une espèce bactérienne, les souches d'origine distincte, ou **clones bactériens**. Ces marqueurs sont utiles lorsque le laboratoire doit affiner le diagnostic infectieux par l'identification bactérienne au – delà de l'espèce. Prenons deux exemples :

- L'incidence d'infections urinaires nosocomiales à ERG augmente parmi les patients d'un service de Néphrologie. Est-ce une épidémie associée à la sélection endogène de mutants résistants ou due à la dissémination d'une souche épidémique ? S'il y a transmission, quel est le véhicule : le personnel soignant, une contamination de l'environnement ? Y-a-t-il un réservoir hors de l'unité de soins ?
- Un patient dépisté ERG négatif à sa sortie du CHU de Nancy, est dépisté porteur quelques jours plus tard au Centre Hospitalier de Vittel. S'agit t-il d'une contamination non détectée par une souche nancéenne ou d'une contamination *in situ* par une souche « Vittel » ?

Sur le plan épidémiologique, ces outils nous permettent donc :

- de confirmer la transmission endémique ou épidémique d'un pathogène au sein d'une population humaine ;
- de déceler l'origine de la contamination et le mode de transmission : inter-humaine, par contact avec un élément contaminé (aliment, matériel médical...) ;
- de suivre l'évolution du réservoir du pathogène au sein d'une population ;
- de mesurer l'efficacité des stratégies de maîtrise et de prévention des épidémies et des infections nosocomiales.

Le typage des souches est donc un pré-requis indispensable à l'établissement de liens épidémiologiques ou phylogénétiques entre différents isolats. De très nombreuses techniques ont déjà été utilisées avec succès pour typer et différencier les souches bactériennes et distinguer les clones.

Chaque technique a ses avantages et ses inconvénients, dépendant de la question posée et de la méthodologie utilisée [Werner et al., 2003 ; Malachowa et al., 2005 ; Werner et al., 2007a].

La méthode la plus utilisée pour le typage des ERG reste l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis) : on parle alors de **pulsotype**, marqueur discriminant pour de nombreuses espèces (*Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*). Cette technique consiste à couper l'ADN génomique extrait avec précaution dans une matrice d'agarose par une enzyme de restriction possédant un faible nombre de sites de coupure. La séparation des fragments obtenus se fait ensuite par électrophorèse en champ pulsé [Freney et al., 2007]. Grâce à sa résolution et à une grande polyvalence, cette méthode est devenue une des méthodes de référence pour le typage de nombreux pathogènes nosocomiaux et communautaires. Dans l'application courante à l'investigation d'épidémies nosocomiales limitées dans le temps, des critères visuels reposant sur le nombre de fragments discordants et d'évènements génétiques associés, permettent de classer les souches selon une probabilité décroissante de lien épidémiologique. Un exemple de répartition des ERG hospitaliers dans divers clusters par PFGE est présentée Figure 23 [Werner et al., 2007a]. Cette technique est utilisée par de nombreux laboratoires en période d'épidémies. Pourshafie et al. ont par exemple mis en évidence l'hétérogénéité clonale des isolats d'*Enterococcus faecium* vanA lors d'une épidémie dans un hôpital de Téhéran [Pourshafie et al., 2008].

Cette méthode est celle actuellement utilisée au laboratoire de bactériologie du CHUN pour le typage des souches d'ERG.

Le typage par séquence multilocus ou MLST (MultiLocus Sequence Typing) est basée sur l'analyse du polymorphisme de gènes domestiques par séquençage nucléotidique. Pour chaque gène ou locus, un allèle est assigné à chaque séquence, et la combinaison des différents allèles fournit un profil allélique qui définit un type particulier pour chaque isolat ou **ST (Sequence Type)**. L'analyse par MLST permet donc de faire des études macro-épidémiologiques (au niveau mondial, pour le suivi de la dissémination des souches de SARM ou d'ERG par exemple) et phylogénétiques. Ainsi la technique

de MLST a montré que les souches nosocomiales épidémiques d'*Enterococcus faecium* *vanA* correspondent à un ST unique [Homan et al., 2002 ; Willems et al., 2005]. Il s'agit cependant d'une méthode relativement lourde au niveau coût et temps d'analyse. L'avantage principal est que les résultats obtenus sont directement interchangeables entre laboratoires. Le MLST est actuellement considéré comme la méthode de référence pour le typage de nombreux pathogènes bactériens [Freney et al., 2007].

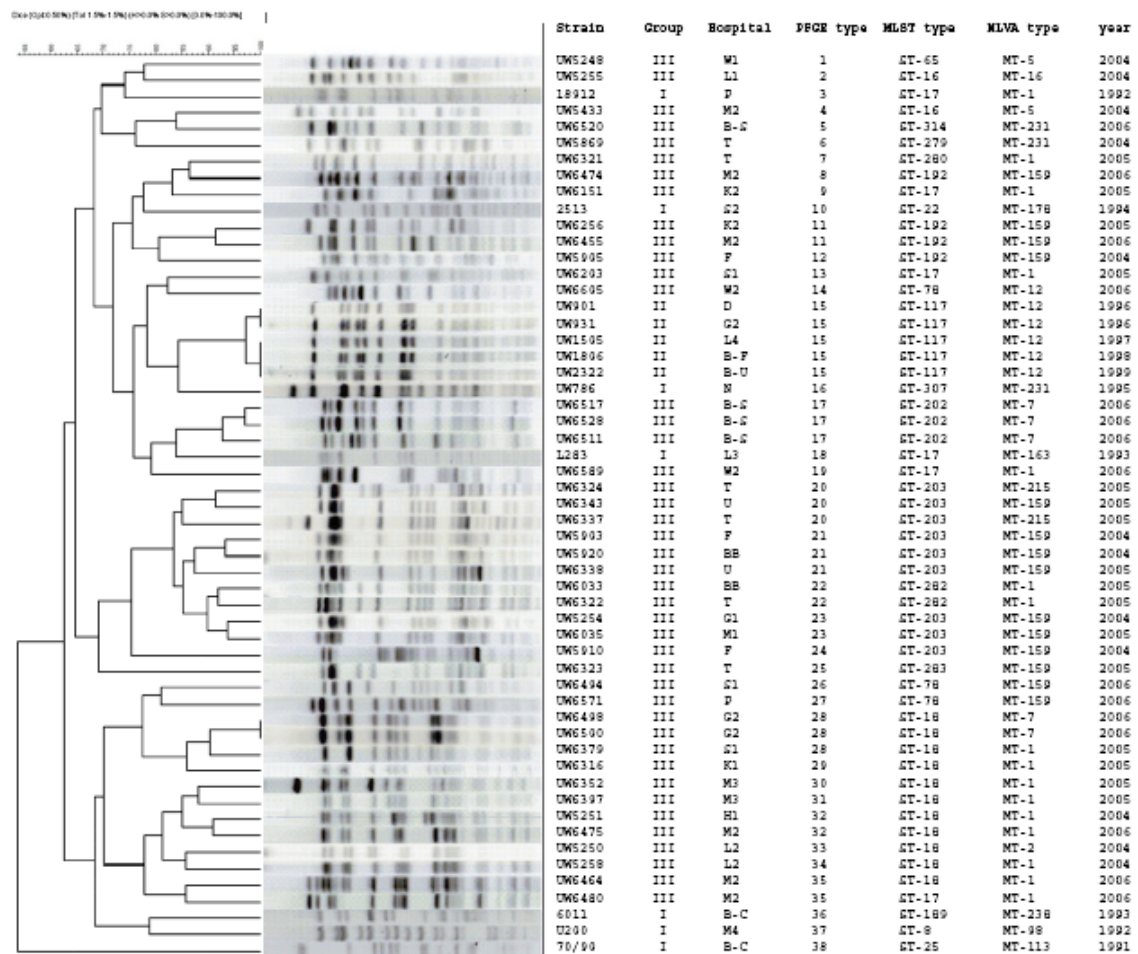


Figure 23 : Exemple d'analyse de répartition des ERG hospitaliers dans divers clusters (58 souches, 31 hôpitaux allemands), basés sur la macro-restriction par SmaI, par technique PFGE (d'après [Werner et al., 2007a]).

Récemment, une nouvelle méthode a été introduite, utilisant de petits éléments répétés apparaissant en nombre variable et distribué différemment sur le génome en fonction des espèces. Cette technique basée sur un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR : Variable Number Tandem Repeats), a été nommée MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) [Lindstedt, 2005]. L'analyse de la taille des différents VNTRs permet l'assignation d'un **profil allélique ou code numérique MLVA**. Cette technique avait initialement été établie pour l'étude de bactéries hautement pathogènes telles que *Bacillus anthracis* ou *Francisella tularensis*. Mais elle a ensuite été étendue à un grand nombre d'espèces bactériennes, et à des questions scientifiques très variables, incluant les investigations épidémiologiques lors d'épidémies [Malachowa et al., 2005], ou pour typer des isolats d'*Enterococcus* spp. [Top et al., 2004].

Mais comment savoir quelle technique choisir afin d'assurer l'appartenance d'un isolat à un clone épidémique ? Récemment, Werner et al. ont comparé ces 3 techniques (PFGE, MLST et MLVA) pour le typage de 58 *E. faecium* *vanA* responsables d'épidémies (infections ou colonisations) dans 31 établissements de soins allemands [Werner et al., 2007a]. Ils ont ainsi montré que : (i) le MLVA est une bonne technique pour assigner les isolats aux principaux clones hospitaliers ; (ii) que pour les isolats du complexe clonal hospitalier, le MLVA est la technique la moins discriminante, et que la technique recommandée doit rester la PFGE pour assurer l'origine d'une souche ; enfin (iii) que de manière générale, le MLVA apparaît inadéquate pour typer *E. faecium* en règle générale, mais cette inadéquation est encore plus marquée dans le cas d'épidémies [Werner et al., 2007a].

Chapitre III : Rôle du laboratoire de bactériologie dans la surveillance et le signalement des infections nosocomiales

L'étymologie du terme nosocomial évoque deux notions un peu différentes : côté latin, le mot *nosocomium* signifie hôpital, ce qui contraint l'infection à dépendre de l'hôpital ou de l'établissement de soins. Côté grec, *nosos* signifie maladie et *komein*, soigner, rattachant plus simplement l'infection nosocomiale à la notion d'acte de soins. Les infections nosocomiales (IN) ne concernent pas uniquement le patient, mais peut aussi inclure sa famille ou les visiteurs, le personnel de l'établissement de soins. Nous allons évoquer dans ce chapitre le plan national d'organisation de lutte contre les infections nosocomiales, et nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle que doit et peut jouer le laboratoire de bactériologie.

3.1. Quelques définitions

- Infection nosocomiale (IN) ou Infections Associées aux Soins (IAS) : une actualisation récente de la définition a été réalisée en mai 2007, permettant d'ouvrir le champ à l'ensemble des infections associées au système de santé ou aux soins. Ainsi, les IAS se définissent comme toute infection survenant au cours ou à la suite d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique ou préventive) d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge. Elle comprend l'IN (au sens classique) et les infections contractées lors de soins délivrés hors des établissements de santé.

Les agents responsables d'IN peuvent être des bactéries, des virus ou des champignons. On désigne par IN toute infection survenant dans un délai d'au moins 48 h (pour les infections bactériennes) ou dans un délai correspondant à la période d'incubation du microorganisme (pour les infections virales et fongiques) après l'admission ou à la suite d'une hospitalisation, et si elle était absente à l'admission à l'hôpital. On considère comme IN du site opératoire une infection survenant dans les 30 jours

suivant l'opération (délai allongé à 1 an si implantation de matériel étranger). Ces infections peuvent être directement liées aux soins (infection d'un cathéter par exemple), ou simplement survenir lors de l'hospitalisation, indépendamment de tout acte médical.

- Infection communautaire : par distinction, on considère comme infection communautaire toute infection survenant moins de 48 h ou dans une période inférieure à la période d'incubation, après l'admission du patient.
- Caractère iatrogène : événement rapportable à un acte de soin, pas forcément de caractère infectieux.
- Epidémie : augmentation de l'incidence d'une maladie infectieuse dans une population donnée sur une période donnée.

On distingue **plusieurs types d'IAS** qui relèvent de modes de transmission différents :

- infections d'origine « endogène » : le patient s'infecte avec ses propres microorganismes, lors d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière (immunodépression, traitement par corticoïdes, plaies profondes type ulcère ou escarre...) ;
- infections d'origine « exogène » : il peut s'agir
 - soit d'infections croisées : transmises d'un patient à l'autre, de façon manuportée (personnel médical ou paramédical), ou par les instruments de soins,
 - soit d'infections provoquées par les bactéries du personnel porteur,
 - soit d'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation...).

Les deux modes de contamination les plus fréquents sont la transmission manuportée, et la rupture des barrières cutanéomuqueuses par procédures invasives (cathétérisme vasculaire, intubation trachéale, sondage vésical, intervention chirurgicale).

3.2. Programme national de lutte contre les IN : place du laboratoire de bactériologie.

Le taux de prévalence globale en France des infections nosocomiales est de l'ordre de 9 %, celui des patients infectés est passé de 6-7% en 2001 à 4,97% en 2006 [Lepoutre et al., 2004 ; Coignard et al., 2007]. Le nombre de décès attribuables aux IN a été récemment estimé à environ 4200 par an en France (étude rétrospective de dossiers dans 16 établissements de santé du CCLIN Paris Nord). L'incidence des IN en France est parmi les moins élevées en Europe et tend à diminuer régulièrement. Les IN sont plus fréquentes dans les services de réanimation, de chirurgie, d'hématologie, de gériatrie, et de soins de suite et de réadaptation. Les infections les plus fréquemment retrouvées sont les infections urinaires, les pneumonies, les infections du site opératoire et les infections sur cathéter. Les bactéries sont les microorganismes les plus fréquemment en cause, et on retrouve en tête : *Escherichia coli* (24,7%), *Staphylococcus aureus* (18,9%), *Pseudomonas aeruginosa* (10%) et les différentes espèces d'entérocoques (6%). De façon globale, le taux de résistance des bactéries responsables d'IN est élevé ; les ERG représentent ainsi près de 10% des entérocoques isolés d'IN (2,4% pour *E. faecalis*, vs. 7,3% pour *E. faecium*) [Coignard et al., 2007].

La surveillance des IAS est essentielle à leur prévention. Différents dispositifs et outils sont à la disposition des professionnels de santé, et le bactériologiste médical se doit d'y jouer un rôle majeur. C'est ce que nous allons développer dans ce chapitre.

3.2.1. Un dispositif spécifique mis en place au niveau local, régional et national

La lutte contre les IAS a été définie comme une priorité de Santé Publique. Le dispositif de lutte contre les IAS est porté par différentes institutions spécifiques. En 1988, le ministère instaurait par décret la création des **Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN)** dans les établissements publics de santé. Pour soutenir l'action de ces instances hospitalières, des structures de

coordination et de conseil, inter-régionales (**Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales, CCLIN**) et nationales (**Comité Technique national des Infections Nosocomiales, CTIN**), ont été créées depuis 1992.

Un plan de lutte à 5 ans, annoncé en novembre 1994, a inscrit l'ensemble des actions engagées dans un véritable programme de prévention nationale. Il comprend plusieurs axes de travail avec pour objectif de réduire la fréquence des IN et la dissémination des BMR. La loi du 1^{er} juillet 1998, relative à la sécurité sanitaire, puis le décret du 6 décembre 1999, ont étendu ce dispositif aux cliniques privées. Pour la surveillance, **un partenariat entre les cinq CCLIN et l'InVS (Institut national de Veille Sanitaire) a permis de créer le Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN)**. Ce réseau est responsable de la réalisation d'enquêtes nationales de prévalence (1^{ère} enquête en 1996, 2^{ème} en 2001, 3^{ème} en 2006 en cours d'analyse), permettant de faire le point sur la situation française en matière d'IN, et d'évaluer l'impact de la mise en place des diverses mesures de prévention. Le dispositif de signalement des IN, quant à lui, est en place depuis juillet 2001. Chacune de ces institutions a une composition et des rôles bien définis :

✱ **Rôle des CLIN** : organiser et coordonner la surveillance, la prévention et la formation continue en matière de lutte contre les IN. Il est composé de médecins, pharmaciens, infirmières, directeur de l'établissement et autres professionnels de l'établissement. Ce comité est assisté d'une **Equipe Opérationnelle d'Hygiène Hospitalière (EOHH)**, composée d'un médecin ou pharmacien, d'une infirmière hygiéniste, et parfois de techniciens. La taille et la composition de cette équipe dépend des besoins de l'établissement. **Les CLIN sont les premiers interlocuteurs des différents acteurs de Santé, parmi lesquels figurent les bactériologistes.**

✱ **Rôle des CCLIN** : ces centres de référence servent d'appui technique aux établissements hospitaliers et travaillent au niveau d'une inter-région ; il en existe 5 : Est, Ouest, Paris- Nord, Sud-Est, Sud-Ouest. Ils sont chargés de mettre en place la politique définie au niveau national et d'animer la coopération inter-hospitalière (réseau de surveillance, formation, documentation, études...).

* **Rôle du CTIN** : c'est une instance de proposition, de coordination et d'évaluation, constituée d'experts hospitaliers, de représentants des administrations et des agences de sécurité sanitaire. Ce comité propose des objectifs prioritaires et des méthodologies standardisées de surveillance et de prévention.

* **Rôle de la cellule « infections nosocomiales »** : commune à la DGS (Direction Générale de la Santé) et de la DHOS (Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins), elle est chargée de coordonner l'ensemble de ce dispositif.

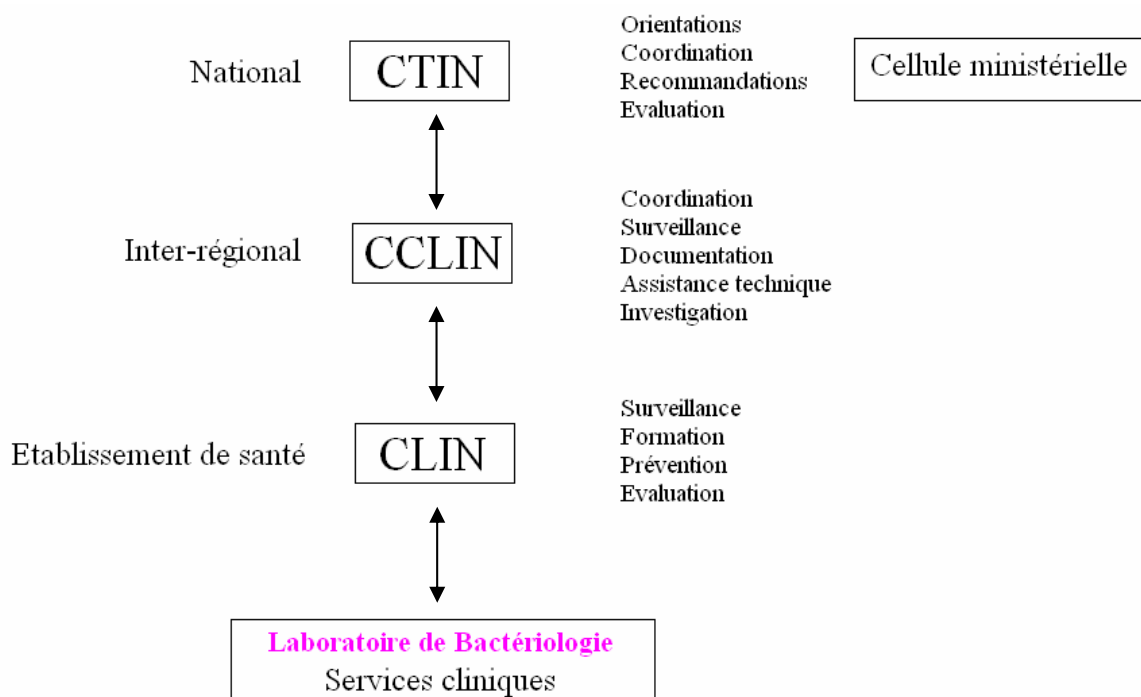


Figure 24 : Place du laboratoire de Bactériologie dans le système de lutte contre les IAS.

Quelques textes législatifs de référence :

Arrêté du 17 mai 2006, relatif aux antennes régionales de lutte contre les infections nosocomiales.

Décret 2005-840 du 20 juillet 2005 : définit les conditions d'organisation de la lutte contre les IN (abroge le décret 99-1034 du 6 décembre 1999).

Circulaire DGS/DHOS/E2 – N°645 du 29 décembre 2000, relative à l'organisation de la lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de santé (abroge la circulaire N°263 du 13 octobre 1988 et la circulaire DS/VS/VS2 17 du 19 avril 1995).

Arrêté du 3 août 1992, relatif à l'organisation de la lutte contre les infections nosocomiales : définit la création du CTIN et les missions des CCLIN.

3.2.2. Programme national de lutte contre les IAS 2005-2008 : cinq grands axes

Ce nouveau plan est destiné à consolider les structures : nouveau **Comité Technique national des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux Soins (CTINILS)**, centré sur l'expertise et distingué des fonctions d'aide à la définition des politiques et de suivi du programme, consolidation des EOHH. Ce plan entend aussi développer l'expertise (formation) et ouvrir la lutte contre les IN sur l'extérieur (les infections liées aux soins et la gestion des risques) en développant les échanges entre les équipes inter-hospitalières, avec les établissements de soins de suite et de longue durée, les usagers et le public. **Il vise également à valoriser la recherche en s'appuyant sur les structures existantes.** Enfin, il vise à mieux prendre en compte la dimension extra-hospitalière (infections post-opératoires tardives, hospitalisation à domicile, maisons de retraite), et rester en alerte sur les risques émergents (veille et signalement). Ce programme 2005-2008 s'articule ainsi autour de cinq grands axes, au sein desquels les **laboratoires hospitaliers de bactériologie** ont un rôle important à jouer :

① Adapter les structures et faire évoluer le dispositif de lutte contre les IAS.

② Améliorer l'organisation des soins et les pratiques des professionnels ayant un impact sur le risque infectieux.

→ Veiller à la mise en place d'une **politique de bon usage des antibiotiques**.

→ Renforcer la **prévention de la transmission croisée de BMR** par les précautions de contact (hygiène des mains), la **détection des patients porteurs**.

③ Optimiser le recueil et l'utilisation des données de surveillance et du signalement des IAS.

Instaurer un tableau de bord des IAS ; ce tableau repose sur cinq indicateurs en cours de validation :

- indice composite d'évaluation des activités de lutte contre les infections nosocomiales
- taux d'infection du site opératoire par acte opératoire
- volume annuel de solutés hydro-alcooliques (SHA) par journée-patient
- **taux de SARM pour 1000 journées-patient** (bientôt taux d'ERG pour 1000 journées-patient ?)
- suivi de la consommation des antibiotiques

④ Mieux informer les patients et communiquer sur le risque infectieux lié aux soins.

⑤ Promouvoir la recherche sur les mécanismes, l'impact, la prévention et la perception des IAS.

→ **Améliorer la compréhension des mécanismes de survenue des IN** (par exemple, étude des relations entre colonisation pré-opératoire par des bactéries à différents sites et infections du site opératoire).

→ **Etudier les facteurs microbiens associé au potentiel de diffusion des pathogènes nosocomiaux** dans le milieu hospitalier.

→ **Développer les techniques de diagnostic rapide** afin d'améliorer les stratégies de prophylaxie et de prise en charge précoce.

3.2.3. Signalement des IAS

Le dispositif de signalement relatif à la lutte contre les IAS et à l'information des patients est décrit dans le décret 2001-761 du 26 juillet 2001, ainsi que dans la circulaire 2001-383 du 30 juillet 2001.

▣ Objectifs

- alerte des autorités sanitaires départementales (DDASS) et du CCLIN : mise de place d'un dispositif de prévention d'extension des cas,
- création d'une banque de données nationale des IN,
- suivi épidémiologique,
- détection des nouveaux risques infectieux : établissement de recommandations.

▣ Critères de signalement

Leur choix est laissé à l'initiative des CLIN :

- IAS ayant un caractère rare ou particulier, par rapport aux données épidémiologiques locales, régionales ou nationales, du fait :
 - de la nature ou des caractéristiques de l'agent pathogène en cause, de son profil de résistance aux antibiotiques,
 - de la localisation (mise en jeu du pronostic vital ou risque de séquelles fonctionnelles importantes),
 - de l'utilisation d'un dispositif médical contaminé,
 - de procédures ou pratiques pouvant exposer ou avoir exposé, lors d'un acte invasif, d'autres personnes au même risque infectieux (situations épidémiques).
- Infections ayant entraîné un ou plusieurs décès.

- Infections liées à un micro-organisme de source environnementale (eau, air).
- Maladies devant faire l'objet d'une déclaration obligatoire et dont l'origine nosocomiale est suspectée.

Donc, toutes les BMR et toutes les infections liées à un dispositif invasif ne doivent pas obligatoirement être signalées.

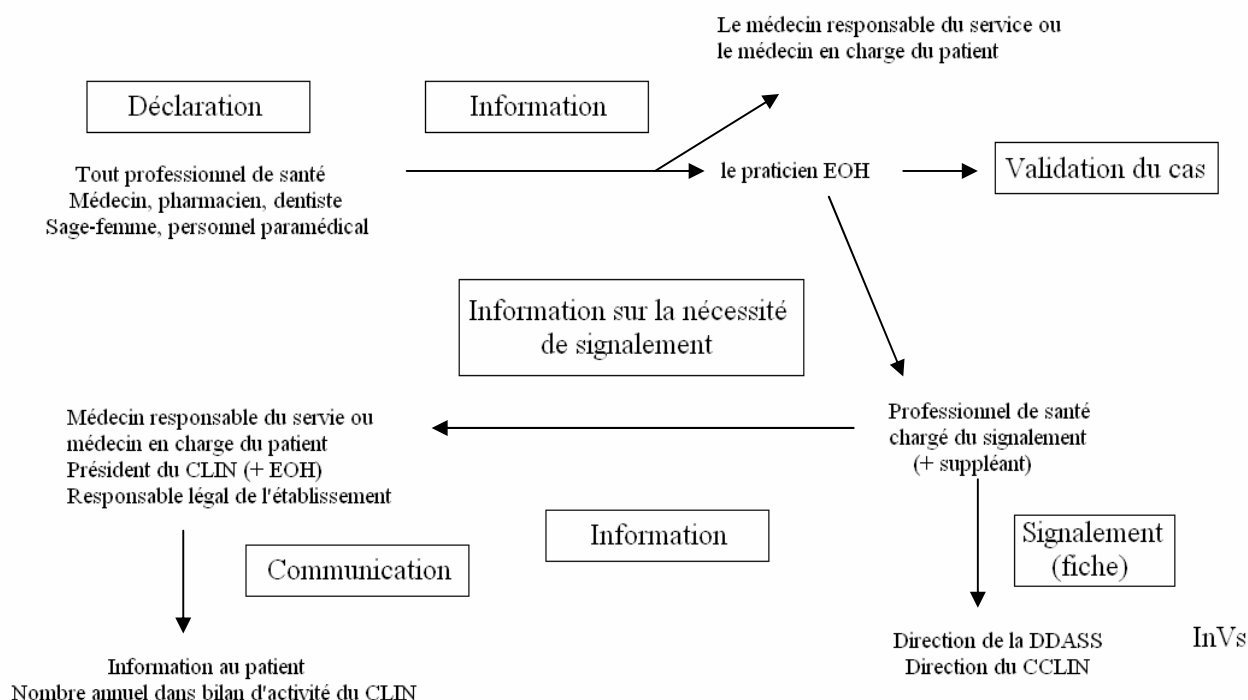


Figure 25 : Circuit de signalement des infections associées aux soins.

☐ Devant une suspicion de phénomène épidémique : rôle du laboratoire de bactériologie

Le laboratoire de bactériologie est un élément essentiel du système de surveillance des IAS. Dans un établissement de soins, il centralise l'ensemble des prélèvements et peut ainsi être à l'origine de :

- **Alerte**

Informers les intervenants (EOHH, service clinique).

- **Affirmation de la réalité de l'épidémie**

Confirmer l'identité des souches et les conserver : identification classique, sérotypage, antibiogramme, typage moléculaire (par un laboratoire spécialisé ou un centre de référence, généralement par électrophorèse en champ pulsé).

Rechercher la source de l'épidémie : humaine ou environnementale.

EN RESUME

Les infections associées aux soins sont préoccupantes en raison de leur morbidité et mortalité importantes, du surcoût qu'elles engendrent, de l'émergence de BMR telles que les ERG. Il est important de reconnaître le caractère nosocomial d'une infection car (i) le choix du traitement est conditionnée par la résistance fréquente des bactéries aux antibiotiques ; (ii) certaines IN sont soumises à un signalement obligatoire ; et (iii) la surveillance de certaines IN est recommandée, en particulier dans un contexte épidémique (amélioration des pratiques, démarche qualité, accréditation). La prévention des IN est un objectif primordial de Santé Publique, et le bactériologiste est une des pierres angulaires de ce système. La survenue d'une épidémie, telle que celle à ERG qui se déroule actuellement au CHU de Nancy, nécessite une vigilance de chaque instant, par une équipe pluridisciplinaire, et implique la mise en œuvre, par le laboratoire de bactériologie, de techniques performantes pouvant affirmer le lien épidémiologique entre les souches isolées dans différents services ou établissements de soins.

CONCLUSION

Chez les entérocoques, la compréhension des mécanismes de résistance aux glycopeptides est bien avancée. Cependant, l'origine des gènes de résistance et des bactéries résistantes reste encore non élucidée. Les glycopeptides, seuls ou en association avec les aminosides, constituent souvent la seule thérapie pour les infections à entérocoques ou à staphylocoques multi-résistants. L'émergence et la dissémination de bactéries à haut niveau de résistance aux glycopeptides depuis une vingtaine d'années inquiète du fait de l'impasse thérapeutique à laquelle cela aboutit : l'acquisition de résistances et la formidable adaptation des bactéries restent plus efficaces que la recherche de nouvelles thérapeutiques anti-infectieuses ! Heureusement, les entérocoques sont des espèces peu pathogènes. La dissémination de la résistance aux glycopeptides chez des bactéries plus pathogènes telles que les staphylocoques (en particulier les SARM) ou les streptocoques s'est déjà produite, du fait de l'absence de barrière d'expression ou de transfert des gènes de résistance entre ces espèces. La mobilité des clusters de gènes *vanA* ou *vanB* par conjugaison ou transposition facilite cette dissémination de la résistance. Cependant, cette transmission reste, heureusement, rare.

La commercialisation récente de nouvelles molécules telles que le linézolide, la daptomycine ou la tigécycline ont fait renaître un espoir... bien mince cependant, étant donné les restrictions de recommandations et le coût de ces nouveaux antibiotiques... les 1^{ères} souches d'ERG résistantes à ces molécules ayant déjà été signalées à différents endroits du monde... D'où l'importance de la maîtrise des épidémies afin d'éviter la dissémination des souches d'ERG mais aussi la transmission des gènes de résistance ; c'est ce qui va être exposé dans la seconde partie de ce mémoire.

2^{ème} partie

Un point épidémiologique.

Gestion d'une épidémie à *Enterococcus faecium* vanA au CHU de Nancy et dans la région Lorraine.

L'épidémie d'ERG (Entérocoques Résistants aux Glycopeptides) au CHU de Nancy (CHUN) a connu des épisodes successifs, nécessitant la mise en œuvre de moyens colossaux, tant matériels que humains, impliquant à la fois les personnels soignants et administratifs, nécessitant une gestion et une veille de chaque instant, par des équipes multidisciplinaires coordonnées. Afin de mieux comprendre les origines et l'ampleur de l'épidémie survenue en 2007, il est indispensable de reprendre la genèse de l'apparition et de la dissémination des ERG, même si l'origine exacte, en temps et en lieu, n'a jamais pu être clairement déterminée.

Nous étudierons donc dans une 1^{ère} partie la chronologie de cette épidémie depuis fin 2004, en s'appuyant sur des données fournies par la Cellule Enquête et Action (CEA) et par le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) du CHUN. Nous tenterons de comprendre l'origine et les causes d'extension de l'épidémie (Pourquoi le service de Néphrologie a-t-il été le foyer d'origine ? Pourquoi l'épidémie s'est-elle rapidement étendue à d'autres services ?), et nous appuierons la discussion sur l'importance des décisions prises et du délai de mise en place des différentes mesures. Dans une 2^{ème} partie, nous nous étendrons sur la résurgence de l'épidémie depuis fin 2006, ses raisons et l'importance de la réactivité des différentes équipes à cette occasion. Les mesures suivantes ont été mises en place simultanément : (1) création d'une « Cellule Enquête et Action », multidisciplinaire ; (2) cohorting des patients porteurs dans un secteur dédié ; (3) dépistage des sujets contacts, sans cohorting ; (4) évaluation et mise en place d'une technique sensible et spécifique pour la détection des ERG dans les écouvillons rectaux ; (5) prescription raisonnée des antibiotiques, avec référence à un spécialiste en anti-infectieux ; (6) information et éducation du personnel soignant, au lavage des mains et aux procédures d'isolement ; et enfin, (7) mise en place d'une liste informatisée sécurisée des patients porteurs afin de faciliter les transferts et les réadmissions. Nous discuterons la pertinence et l'importance de chacune de ses mesures, et de leur place relative dans une stratégie de contrôle d'une épidémie à ERG.

Chapitre I : 2004-2005 : une épidémie d'ERG qui naît et qui grandit...

1.1. Décembre 2004 : 1^{ère} vague de l'épidémie (infections urinaires/colonisations à ERG dans le service de Néphrologie)

En 2004, le Père Noël a eu une pensée particulière pour les patients et le personnel du CHU de Nancy. Au pied du sapin, le soir du 24 décembre, deux cas d'infections urinaires à ERG ont été déposés. Le laboratoire de bactériologie signale au service d'hygiène hospitalière deux nouveaux ECBU répondant aux critères « infection » ($> 10^4$ polynucléaires, $> 10^4$ bactéries). Une première recherche effectuée dans le logiciel BACTERIO (utilisé au laboratoire de bactériologie pour la gestion informatique des prélèvements et du rendu des résultats), objective deux autres cas potentiels, avec un lien dans le temps et dans l'espace entre ces quatre premiers patients porteurs. Une visite sur site est décidée immédiatement pour déterminer s'il peut s'agir d'une épidémie. Le correspondant médical et le praticien hospitalier référent de l'unité sont rencontrés, ainsi que le cadre de santé. Des recommandations immédiates sont instaurées concernant le lavage des mains, l'isolement contact et la traçabilité des patients porteurs (liaison et transmission de l'information au médecin traitant, au service de dialyse ainsi qu'à l'hôpital de Jour).

Le 27 décembre 2004, l'information est transmise à l'ensemble des chefs de service, au CCLIN Est (Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales) et à la DRASS (Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales). Une série d'articles scientifiques est transmise aux néphrologues sur l'implication des ERG dans des épidémies avec incrimination du défaut d'hygiène des mains et la nécessité d'isolement « contact » des sujets porteurs, sur la possibilité de transmission plasmidique des facteurs de résistance (*vanA*) aux staphylocoques, et sur la capacité du germe à persister dans l'environnement pendant au moins 4 mois.

Un écouvillonnage rectal est recommandé chez tous les patients du service de Néphrologie. Deux autres cas sont dépistés : un dans le service de Médecine B, l'autre dans le service d'Hépatogastro-Entérologie (HGE). Le laboratoire de bactériologie est contacté pour réaliser un typage des souches.

✱ Lien temporel et spatial entre les différents patients

Une enquête est menée afin de déterminer l'éventuel lien entre les patients porteurs d'ERG. Un lien temporel et spatial est établi entre les quatre premiers patients (nommés par souci de simplification et par ordre de dépistage : Patient 1, Patient 2, Patient 3 et Patient 4...etc). Ils ont tous séjournés dans le service de Néphrologie entre le 1^{er} septembre et le 31 décembre 2004, à des périodes successives et en partie chevauchantes, et dans des chambres contiguës (Figure 26). Le Patient 5 est passé en HGE après le Patient 1, pouvant expliquer une éventuelle transmission par manuportage (personnel soignant ou mobilier de la chambre). Aucun lien n'a pu être établi entre le Patient 6 et les autres sujets.

✱ Explorations bactériologiques

Les souches d'*Enterococcus faecium* isolées chez ces 6 patients présentent un profil de multirésistance aux antibiotiques quasi-identique (Tableau IV). Les seules molécules restant efficaces sont : la nitrofurantoïne et le chloramphénicol pour l'ensemble des souches, ± l'ampicilline, ou le cotrimoxazole. L'analyse par PFGE (« Pulsed Field Gel Electrophoresis » ou Electrophorèse en Champ Pulsé) a montré une identité de pulsotype entre les souches isolées chez les quatre patients de Néphrologie, objectivant une même origine clonale. Ces souches possèdent toutes le gène *vanA* (identifié par « Polymerase Chain Reaction », PCR).

✱ Conclusions de cette 1^{ère} vague

Une épidémie d'infections et/ou colonisation à ERG s'est déclarée chez des patients particulièrement à risque de ce type de portage [Freitas et al., 2006]. Une évaluation des procédures d'hygiène des mains et d'isolement contact a été effectuée, ainsi que le renforcement de la signalisation BMR. Les services concernés par cette 1^{ère} vague sont : Néphrologie, Médecine B (Gériatrie) et HGE.

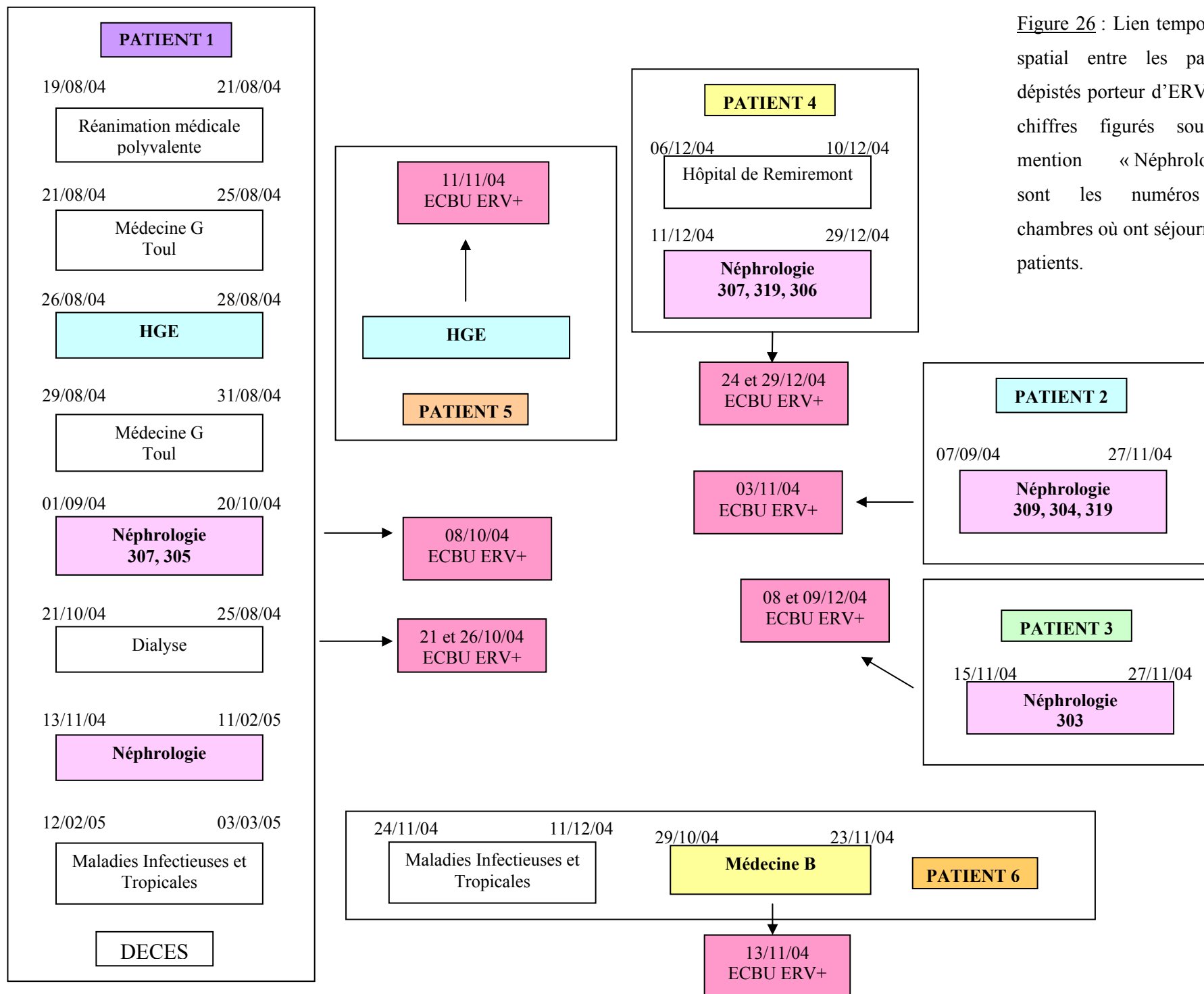


Figure 26 : Lien temporel et spatial entre les patients dépistés porteur d'ERV. Les chiffres figurés sous la mention « Néphrologie » sont les numéros de chambres où ont séjourné les patients.

Tableau IV : Antibiotogramme, recherche du gène *vanA* par PCR et pulsotypage des différentes souches d'ERG isolées en décembre 2004.

Service	Néphrologie				HGE	Méd B
Patients	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Antibiogramme						
Pénicilline G	R	R	I	R	R	R
Ampicilline	R	R	R	R	R	R
Pipéracilline	R	R	I	R	R	R
Chloramphénicol	S	S	S	S	S	S
Tétracyclines	R	R	R	R	R	S
Erythromycine	R	R	R	R	R	R
Cotrimoxazole	R	S	R	S	R	S
Ciprofloxacine	R	R	I	R	?	R
Nitrofurantoïne	S	S	S	S	?	S
Vancomycine	R	R	R	R	R	R
Teicoplanine	R	R	R	R	I	S
Fosfomycine	R	R	R	R	?	R
PCR <i>vanA</i>						
	oui	oui	oui	oui	?	oui
PFGE						
	Même origine clonale				Non testé	Non testé

1.2. Janvier 2005 – Mai 2005 : 2^{ème} vague de l'épidémie (épidémie à *Enterococcus faecium vanA* à l'Hôpital de Brabois)

Suite à la découverte de quatre nouveaux cas en janvier 2005 (2 en réanimation médicale TD6, et 2 en HGE), une gestion centralisée de l'épidémie est mise en place avec la **création d'une Cellule Enquête et Action (CEA)** le 3 février 2005. Cette cellule est constituée de :

- représentants de chaque service concerné par l'épidémie,
- référents de l'Equipe Opérationnelle d'Hygiène Hospitalière (EOHH),

- représentants de la Direction du CHU, de la DSSI, ainsi que le Directeur du Service Qualité et Gestion des Risques,
- représentants du laboratoire de bactériologie.

Cette 2^{ème} vague concerne des souches infectieuses, isolées dans des hémocultures ou à partir de drains, par exemple. On identifie 10 patients porteurs d'ERG. L'ampleur de l'épidémie n'est alors pas connue véritablement ; une campagne de dépistage « un jour donné » est fixée au 8 février 2005 (**campagne de dépistage n°1**).

Les mesures mises en place précédemment sont renforcées, avec la mise en place d'un dépistage des patients à l'entrée et une fois par semaine en TD6. La question est posée sur la réalisation d'un **cohorting** (**sectorisation des patients ERG+ avec un personnel soignant dédié**), chaque service ne pouvant mettre en place un tel système. Il est décidé qu'une partie du service de maladies infectieuses et tropicales (TD8) doit être dédié au cohorting des porteurs.

Le fonctionnement de deux services est mis en veille :

- TD6 : arrêt des admissions par fermeture de lits (travaux prévus avant la découverte des cas d'ERG, sont l'occasion d'un nettoyage de tous les locaux)
- Néphrologie : arrêt momentané des admissions et des greffes afin d'effectuer un nettoyage complet du service.

Mi-février 2005, on compte quatre décès de sujets colonisés-infectés à ERG, la question est posée de l'imputabilité de ces décès à la présence de l'ERG. Six nouveaux cas ont été dépistés en néphrologie (**campagne de dépistage n°1**). Les sujets contact sont prélevés et contrôlés 48 h après le transfert des patients porteurs en TD8.

Les antibiogrammes réalisés sur ces nouvelles souches révèlent une **sensibilité au linézolide et une résistance intermédiaire aux synergistines**.

Fin mars 2005, huit services sont concernés par l'épidémie, tous localisés sur le site de Brabois : **cardiologie, chirurgie viscérale, HGE, médecine B, néphrologie, TD6, TD8 et urologie**. Les dépistages sont maintenus à l'entrée, et de façon hebdomadaire, sans isolement contact probabiliste. Les 1^{ères} tentatives de décolonisation sont réalisées sur les patients cohortés en TD8 ; un traitement par streptomycine, par voie orale, à raison de 1g trois fois par jour, pendant 10 j semble efficace. Une nouvelle campagne de sensibilisation est menée par l'EOHH sur la nécessité d'un parfait respect des procédures de lavage des mains ou du port de gants. Une note d'information en ce sens est alors adressée aux différents chefs de service concernés.

Des campagnes de dépistage « un jour donné » sont réalisées en **avril 2005** (**campagne de dépistage n°2**), mettant en évidence de nouveaux cas dans les services suivants : HGE n = 3, médecine B n = 7, urologie n = 1, néphrologie n = 1, chirurgie cardiaque n = 1 ; ainsi qu'un cas en dehors du CHU, dans une maison de retraite. Devant le nombre important de cas dépistés en médecine B, un isolement probabiliste est décidé dans l'attente des résultats chez tout patient entrant.

Au total, depuis le début de l'épidémie (octobre 2004), 32 cas ont été dépistés ; 10 patients sont décédés sans qu'aucune imputabilité à la présence d'ERG n'ai été retenue. Une campagne de dépistage est réalisée en réanimation respiratoire (TD2) et en service de moyen séjour.

La décolonisation par streptomycine ou pristinamycine est efficace (vérification par écouvillonnage rectal 48 et 96 h après la fin du traitement), celle du linézolide en cours d'évaluation.

Dans le cadre d'une recherche de colonisation acquise par transmission inter-humaine directe ou indirecte au sein du CHU, **un dépistage des patients est mis en place à la sortie**. Le différentiel entre les patients dépistés à l'admission et à la sortie, permet d'approcher le taux de colonisation acquise. Cette politique est proposée dans un 1^{er} temps à cinq services : HGE, TD8, Médecine B, Néphrologie, TD6. En conséquence, une mention est ajoutée au bas de la lettre de sortie ou du bon de transfert : « Monsieur ou Madame... a bénéficié le jour de sa sortie du service d'un écouvillonnage rectal à la recherche d'une colonisation éventuelle à ERV. Les résultats sont en attente. Pour tout complément

d'information relatif aux modalités de prise en charge de ce patient, et dans l'attente des résultats de ces dépistages, vous pouvez vous adresser à la Cellule Régionale d'Hygiène Hospitalière. »

Dans ce même contexte, une plaquette explicative est remise à chaque patient porteur, ainsi qu'à sa famille et au médecin traitant (cf. Annexe 1).

Fin avril 2005, la situation régionale était la suivante : des cas isolés ont été détectés dans des maisons de retraite à Essey, Laxou, Maxéville et Vandœuvre, ainsi qu'au centre de Réadaptation de Bainville, et dans deux Centres Hospitaliers (CH) (Thionville et Château Salins) (cf. Figure 31).

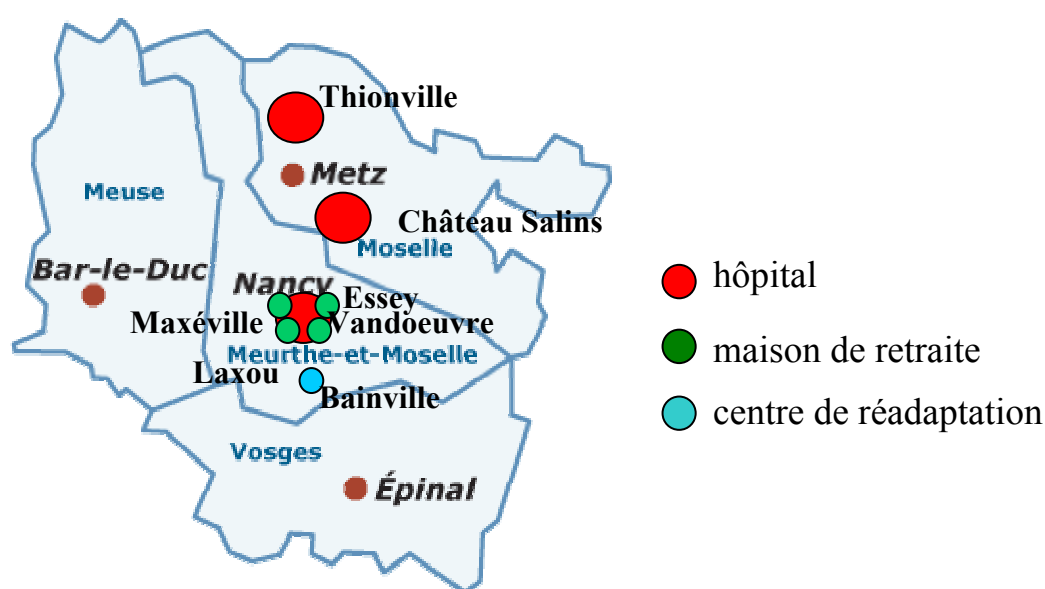


Figure 27 : Situation épidémiologique en dehors du CHUN.

En mai 2005, les campagnes de dépistage « un jour donné » mettent à jour **10 patients porteurs dans le service moyen séjour Spillmann**, cas qui viennent s'ajouter aux nouveaux cas dépistés en HGE n = 1, en médecine B n = 1 et en néphrologie n = 3. Devant l'ampleur de l'épidémie, il apparaît nécessaire d'étendre à tous les services du CHU les campagnes de dépistage « un jour donné ».

1.3. Mai-Juin 2005 : Flambée et point épidémiologique en liaison avec l'InVS

Une **réunion nationale a lieu à l'InVS le 3 mai 2005**, afin de faire le point sur les épidémies d'ERG en France. Trois sites sont concernés : Nancy, Clermont Ferrand et le service de néphrologie de l'Hôpital Kremlin Bicêtre à Paris. Ces épidémies touchent essentiellement les patients fragiles (dialysés, greffés, sous chimiothérapie) [Freitas et al., 2006]. Les études cas-témoins mettent en évidence deux facteurs de risque essentiels :

- le contact ou la proximité avec un patient porteur : d'où l'importance primordiale du respect des mesures d'hygiène et d'isolement ;
- l'existence d'une antibiothérapie préalable (glycopeptides mais aussi C₃G) [De Bruin et al., 2007 ; Paterson et al., 2008].

Diverses études ont mis l'accent sur le nombre limité de molécules à des fins de traitement (synergistines, linézolide à réserver en cas d'usage indispensable), et sur le caractère éphémère de la décolonisation (jusqu'à 75% de re-colonisation à 3 mois).

Cette réunion a permis de faire le point sur deux mesures importantes :

➡ L'exemple du Kremlin Bicêtre a montré que les seules mesures d'isolement géographique et de cohorting ont permis de juguler l'épidémie. Tout relâchement ou manquement à ces règles s'est soldé par une reprise du phénomène épidémique.

➡ La décolonisation doit être considérée comme une méthode à l'effet transitoire, permettant momentanément de réduire le risque de transmission des ERG en réduisant l'inoculum. Ainsi, un patient aux antécédents de colonisation à ERG doit être considéré comme potentiellement toujours porteur s'il est réadmis dans un établissement de soins. D'où la nécessité de signaler cet antécédent de portage au moyen d'un pictogramme.

Dans les suites de cette réunion, un nouveau point épidémiologique est réalisé à Nancy. En date du 24 mai 2005, on compte 53 porteurs dont 4 infections identifiées. Quinze patients sont décédés sans aucune imputabilité à la présence d'ERG. Aux services précédemment concernés s'ajoute le service d'endocrinologie. Afin d'identifier tout nouveau patient porteur et suivre l'évolution de la situation dans les services les plus concernés (médecine B, moyen séjour Spillmann, HGE et néphrologie) est mis en œuvre un dépistage systématique à l'entrée, à la sortie et hebdomadaire.

Une actualisation de l'alerte InVS est réalisée le 24 mai 2005 (cf. Annexe 2).

Début juin 2005, une enquête de prévalence (**campagne de dépistage n°3**) est menée sur l'ensemble du CHU (1800 lits) afin de :

- estimer le pourcentage de patients porteurs et évaluer ainsi l'importance de la diffusion de cette souche d'ERG dans l'établissement,
- identifier tous les Services hébergeant des patients porteurs,
- mettre en place des contrôles ciblés dans ces services, en fonction du nombre de patients porteurs identifiés.

Un résumé de l'évolution de l'épidémie, en nombre de cas dépistés (en dehors ou lors des trois campagnes de dépistage menées respectivement en février, avril et mai) est présenté Figures 28 et 29, ainsi que la répartition des cas par services concernés.

Figure 28 : Evolution de l'épidémie entre septembre 2004 et mai 2005, en nombre total de cas dépistés/mois.

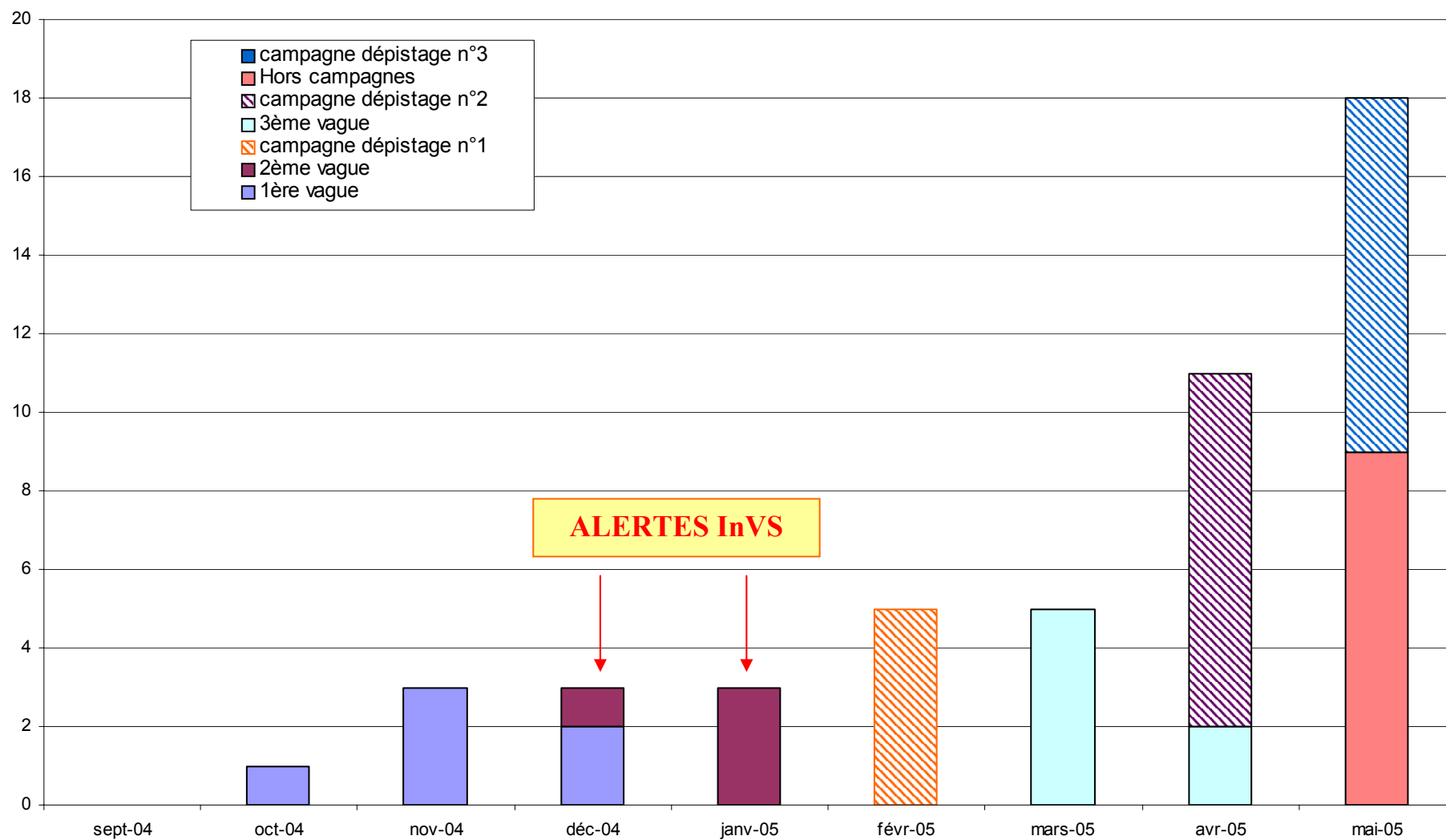
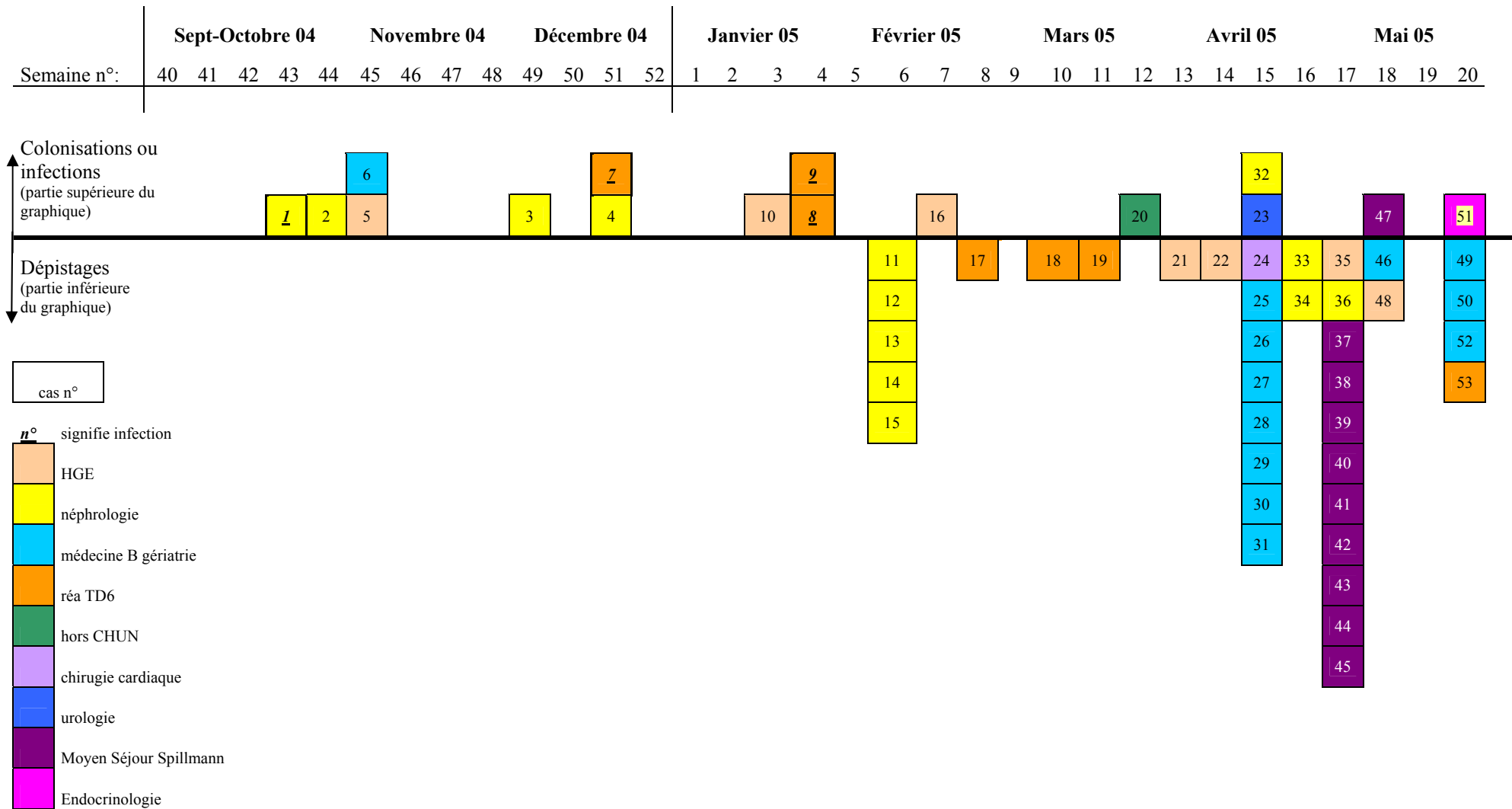


Figure 29 : Evolution chronologique des ERV (en séparant les colonisations ou infections des dépistages).



Chapitre II : Eté 2005 – Eté 2006 : une accalmie ?...

2.1. Evolution vers une fin de l'épidémie ?

Un bilan réalisé en **septembre 2005** montre une évolution bimodale :

- Un net recul dans certains services. Aucun cas n'a été dépisté depuis plusieurs mois en TD6 (aucune mesure spécifique n'est désormais recommandée dans ce service), et depuis plusieurs semaines en néphrologie (dépistage maintenu à l'entrée, à la sortie et hebdomadaire).
- Des cas secondaires avec une cinétique croissante en HGE et en TD7/TD8. Les mesures sont renforcées dans ces services : renforcement des mesures d'isolement technique et géographique (chambres individuelles, regroupement dans des chambres contiguës séparées du reste du service, maintien d'une chambre tampon vide), programmation de prélèvements de mains chez le personnel médical et paramédical. Les dépistages des patients sont là aussi maintenus.

Le bulletin d'alerte InVS est actualisé le **11 octobre 2005** (cf. Annexe 3).

Au total, 131 cas ont été recensés depuis le début de l'épidémie (décembre 2004). Aucun cas n'a été signalé depuis le 1^{er} octobre 2005.

L'EOHH a rendu le **résultat des audits de pratique** réalisés dans les différents services. Une enquête cas-témoins menée au sein de l'ensemble des services touchés, a révélé quatre facteurs de risque principaux :

- **le portage de SARM durant le séjour hospitalier,**
- **un traitement par glycopeptides ou C₃G,**
- **une toilette avec un savon solide (!!!),**
- **et la réalisation de soins par des kinésithérapeutes, ergothérapeutes ou ophtalmologistes.**

Ces audits de pratique ont mis en évidence **différents points faibles** :

- au niveau de l'hygiène de mains :
 - mauvaise observance,
 - durée (temps très courts) et techniques de lavage des mains inadaptées,
 - type de lavage non respecté (savon antiseptique ou SHA),
 - utilisation des SHA : pas de date d'ouverture, beaucoup de flacons ouverts, diffusion de l'utilisation encore perfectible,
 - utilisation des gants : absence fréquente de lavage des mains au moment du retrait ou du changement de gants, parfois lavage des mains gantées.
- au niveau du ménage :
 - hors chambre d'isolement : tissus préparés à l'avance devant les chambres, pas de balayage humide systématique, mauvaise utilisation des produits (doses), entretien des sanitaires variable selon les agents (non respect du protocole CHU),
 - dans les chambres d'isolement septique : pas de balayage humide, bidons remplis de Bactilysine® jamais décontaminés, pris avec ou sans gants, absence de décontamination du matériel entre deux chambres isolées.
- lors des soins :
 - pas de décontamination quotidienne systématique des humidificateurs à oxygène,
 - trop de stockage de linge propre dans le secteur ERG.

Diverses mesures ont été mises en place afin de lutter au mieux contre les ERG, en connaissant ces différentes lacunes :

- dépistage/isolement ± décolonisation des patients à risque de portage de SARM,

- mise en place d'une nouvelle politique de bon usage des antibiotiques, en relation avec les infectiologues et les pharmaciens hospitaliers,
- un abandon des savons solides (y compris ceux amenés par les patients),
- une diffusion plus large des SHA avec un protocole précis de lavage des mains : 1 dose (= 3 mL) dans le creux de la main en frictionnant jusqu'à évaporation (30 s). Il est rappelé que les SHA ne doivent pas être utilisés si : mains visiblement souillées, mains mouillées, gants poudrés, si suspicion de *Clostridium difficile* (sélection des spores). Il est impératif d'écrire la date d'ouverture sur les flacons,
- une information et formation des divers professionnels de santé.

Dans les cinq services les plus touchés (HGE, Néphrologie, Médecine B, TD8, Moyen Séjour Spillmann), la vigilance est maintenue (isolement entérique des patients porteurs ou avec antécédents de portage, dépistage), et 12 lits supplémentaires sont ouverts.

En janvier 2006, la situation épidémique semble sous contrôle : on compte 144 cas (+ 13 cas depuis le 13 octobre 2005), 52 décès dont aucun n'est imputable à la présence d'ERV.

En avril 2006, face à ces données rassurantes, la dissolution de la CEA est décidée, avec un allègement des modalités du suivi épidémiologique. Cette dissolution avait plusieurs objectifs :

- éviter d'installer la CEA dans un fonctionnement routinier, donc moins efficient,
- éviter de laisser les personnes impliquées dans la gestion de l'épidémie, cette gestion nécessitant une mobilisation constante depuis plus d'un an,
- libérer du temps et des compétences pour la prise en charge d'autres problématiques épidémiques et/ou nosocomiales.

Une veille est cependant maintenue par différents acteurs (EOHH, Laboratoire de Bactériologie, CLIN...) : suivi des identifications de souches d'ERG à partir des prélèvements cliniques, maintien du cohorting des patients porteurs, poursuite des audits et des enquêtes de prévalence.

2.2. Analyse rétrospective du déroulement de l'épidémie fin 2004 à début 2006 : mesures mises en œuvre et analyse de leur impact

Les mesures immédiates mises en place fin décembre 2004, juste après la découverte des premiers cas ont été les suivantes :

- isolement type BMR,
- contrôle du portage rectal chez les patients ERG+,
- renforcement des mesures d'hygiène des mains.

Devant notre manque évident de connaissances quant à la façon de gérer une telle épidémie, une lecture attentive de la littérature a été réalisée [Sohn et al., 2001 ; Pearman et al., 2003 ; Lepelletier et al., 2004 ; Shadel et al., 2006 ; Lucet et al., 2007], mettant en évidence les précautions suivantes à prendre :

- application stricte des précautions standard, notamment renforcement de l'hygiène des mains [Pittet et al., 1999 ; Lai et al., 2006] : **FAIT**
- dépistage systématique de tous les patients hospitalisés, entrée + hebdomadaire, par écouvillonnage rectal et/ou ECBU : **FAIT mais avec un certain retard et par étapes**
- isolement de type contact pour les patients porteurs : **FAIT**
- cohorting des patients porteurs : **FAIT**
- nettoyage quotidien des surfaces [Hayden et al., 2006 ; Eckstein et al., 2007] : **FAIT**
- traçabilité des patients et signalisation du portage en cas de transfert : **FAIT**
- réflexion sur la pression antibiotique : **FAIT**

- formation du personnel médical et paramédical : **FAIT**
- information des patients et des familles, du médecin traitant : **FAIT**

Les principales recommandations ont donc bien été respectées, le seul point négatif étant le retard au dépistage de l'ensemble des patients, non réalisé en une seule campagne pour des causes évidentes de difficultés de mise en place et de manque de moyens (matériels et humains).

Lors de cette 1^{ère} épidémie, le service de néphrologie a servi de témoin pour l'évaluation de l'importance et de l'impact des mesures mises en place. Plusieurs audits ont été réalisés, les résultats sont présentés ci-après (Tableau V).

Tableau V : Adéquations mesures recommandées et mesures mises en place dans le service de néphrologie dans les 1^{ers} mois de l'épidémie.

Mesures recommandées (rapport du 13/01/05)	Mesures mises en place (état des lieux au 16/02/05)
Renforcement des procédures d'hygiène	Audit des pratiques réalisé par EOHH et auto-évaluation sur hygiène des mains → sensibilisation des équipes soignantes
Dépistage des patients	Dépistage de tous les patients le 03/02/05
Renforcement des précautions d'isolement	<ul style="list-style-type: none"> * Rédaction d'un protocole d'isolement spécifique des patients porteurs d'ERG à partir du protocole disponible dans le service Maladies Infectieuses et Tropicales * Signalisation des patients porteurs (dossier, tableau mural, fiches de liaison inter-établissement) * Information des patients et familles à propos de l'isolement (discussion et livret de la CRH)
Cohorting des patients porteurs identifiés et des soignants	Impossible en Néphrologie : transfert et cohorting en Maladies Infectieuses et Tropicales
Nettoyage quotidien des surfaces	<ul style="list-style-type: none"> - Chambres des patients porteurs en dernier - Matériel à usage unique - Vérification des procédures
Traçabilité des patients et signalisation lors des transferts	Check-list pour gérer les transferts vers les autres services ou établissements, ou les retours à domicile (prévenir le médecin traitant et l'équipe libérale)
Réflexion autour de la réduction de la pression antibiotique	Par l'équipe des référents médicaux du service

Les audits ont par ailleurs montré :

1) certains dysfonctionnements dans les pratiques d'hygiène

- formation des soignants par le personnel de l'EOHH
- auto-évaluation par les cadres du service du lavage des mains

2) une nécessaire mise en cause de certaines pratiques de soins

- sondage urinaire sans système clos
- absence de site de prélèvement sur les poches : augmentation du nombre de manipulations de la sonde urinaire
- technique de réalisation des bandelettes urinaires revue (en accord avec les pratiques du service d'urologie)

Ils ont permis la mise en place de différentes mesures :

1) Rédaction d'un protocole simplifié de prise en charge des patients porteurs

2) Amélioration de l'observance et de l'acceptation des contraintes occasionnées, par les patients et leur famille. Ce sont les livrets explicatifs rédigés par la CRH et distribués aux patients à partir d'avril 2005 (cf. Annexe 1).

3) Signalisation des patients porteurs

- pictogramme BMR sur le dossier patient, dossier infirmier, fiche de liaison inter-établissement.
- tableau de soins : isolement, et son type.

4) Nettoyage journalier des chambres.

Les chambres des patients porteurs sont nettoyées en dernier, avec un matériel dédié. Lorsqu'un patient porteur est dépisté, un décapage et un double nettoyage sont réalisés.

Chapitre III : Fin 2006-2007 : Réveil des ERG et nouvelle épidémie

3.1. Suivi épidémiologique

3.1.1. Novembre 2006 - Mars 2007 : Reprise de l'épidémie

La situation semble avoir été maîtrisée jusqu'à la fin de l'été 2006 ; quelques identifications sporadiques ont malgré tout eu lieu, dont l'analyse pulsotypique *a posteriori* a montré que la souche épidémique n'a jamais totalement disparu du CHUN. Des cas de transmission inter-humaines directes ou indirectes ont eu lieu, mais chez des patients particulièrement fragiles et sous forte pression de sélection antibiotique (réanimation, hématologie, dialyse).

A partir de la fin de l'été 2006, la situation a évolué à nouveau de façon beaucoup plus préoccupante. Des nouveaux cas ont été diagnostiqués chez des patients de Néphrologie, service qui semble bel et bien être un des principaux réservoirs d'ERG au sein du CHUN. Dans un cas au moins, la transmission nosocomiale d'ERG, probablement par manuportage, semble pouvoir être affirmée, entre deux patients hospitalisés dans la même chambre à deux lits.

Le CLIN et l'EOHH ont été alertés très rapidement, et des mesures ont été remises en place ou nouvellement instaurées :

- installation de distributeurs muraux de SHA (Solutés Hydro-Alcooliques) : un par lit,
- installation d'équipements permettant de séparer physiquement deux patients hébergés dans la même chambre (cloisons mobiles, facilement lavables),
- équipement de chaque lit d'un adaptable permettant de mettre à disposition le matériel nécessaire à la réalisation de l'isolement technique (sur blouses et gants).

Il a par ailleurs été décidé de remettre en place une évaluation des pratiques, orientée spécifiquement vers le respect de l'isolement et de réaliser un audit concernant la prise en charge des patients porteurs dialysés chroniques et cohortés.

Concernant les transferts (et retour à domicile) des patients dialysés porteurs, il est remis au patient le livret « hygiène à domicile ». Un livret existe aussi à l'attention des ambulanciers, réalisé et validé par la CRH.

La décision est prise de réaliser une **nouvelle enquête de prévalence, les 6 et 7 novembre 2006**, dans des services cibles de l'établissement : Néphrologie, Dialyse, TD6, Médecine B, HGE, Hématologie adultes et enfants, Neurochirurgie, et Réanimation neurochirurgicale. Cette campagne de dépistage a mis en évidence :

- 6 patients colonisés à ERG en Médecine B,
- 1 nouveau cas en Néphrologie, 1 en Dialyse, 1 en HGE,
- aucun cas dans les autres services investigués.

Compte tenu du nombre important de cas détectés, une **nouvelle déclaration aux autorités de tutelle** est réalisée **le 20 novembre 2006**.

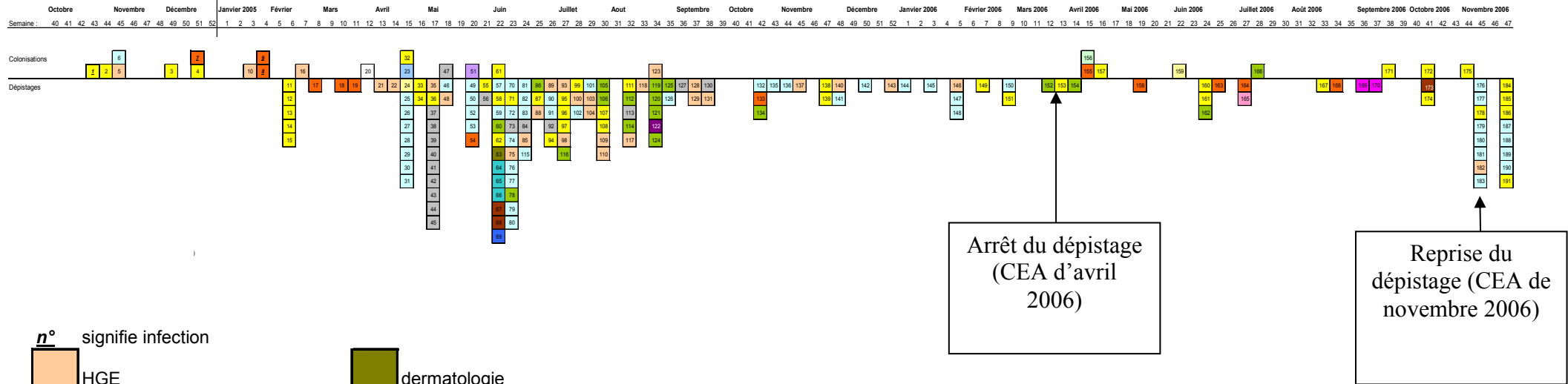
Face à ce regain épidémique, il est décidé de reprendre pour une période d'au moins 2 mois les prélèvements systématiques : entrée, sortie et hebdomadaire, dans les secteurs d'hospitalisation de Néphrologie et de Médecine B. En Dialyse, les patients sont dépistés au rythme d'une fois par mois. Les patients dépistés ou anciennement connus comme porteurs d'ERG sont soumis à un isolement entérique. Du matériel de dialyse et du personnel leur sont dédiés.

✱ Etat des lieux au 22 décembre 2006 (cf. Figure 30)

Plusieurs services sont touchés mais plus particulièrement la Néphrologie et la Médecine B (Gériatrie). De nombreux cas sporadiques ont été dépistés dans d'autres services.

Début décembre 2006 est diffusée une **note co-signée DGS/DHOS** indiquant les mesures à prendre en cas d'épidémie d'ERG (cf. Annexe 4). Cette diffusion s'étend à tous les personnels titulaires du CHU, déclinaison tant au niveau médical que paramédical.

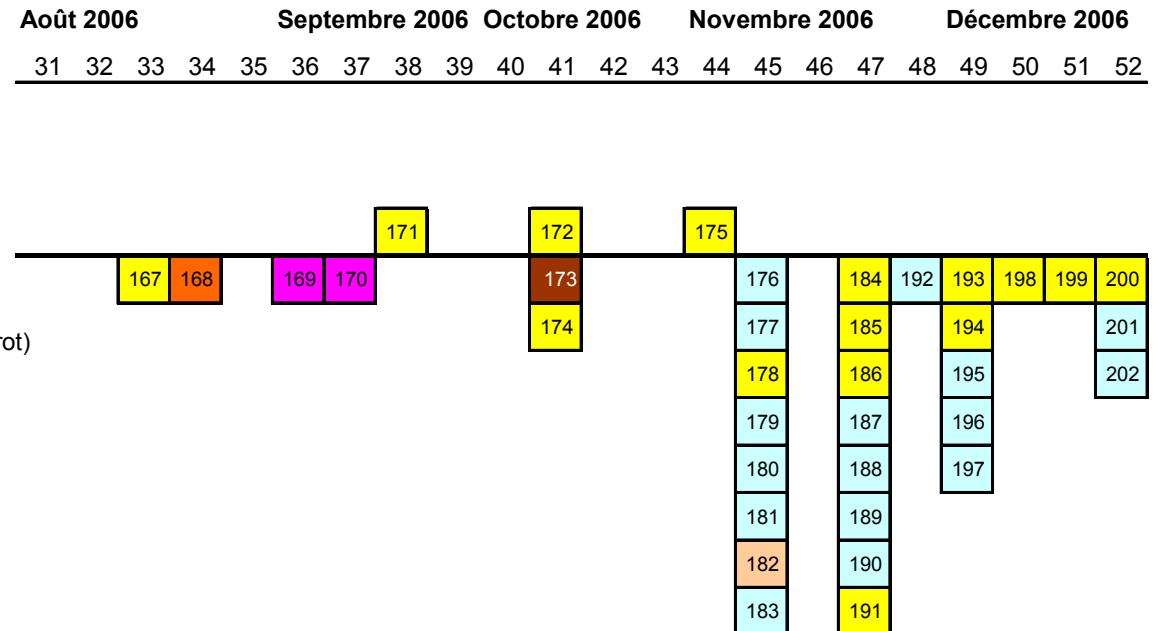
Figure 30 : Courbe épidémique (infections, colonisations et portages) au 22/12/2006.



n° signifie infection

	HGE
	néphrologie / dialyse
	médecine B gériatrie
	réa TD6
	hors CHUN
	chirurgie cardiaque
	urologie
	Moyen Séjour Spillmann
	endocrinologie
	Mal Inf TD8 et TD7

	dermatologie
	LS St Stanislas
	Neurochir. Adulte
	Neurologie
	LS St Julien
	Pneumo
	Chir C
	Onco-hémato (STM + Hémato Prot)
	Chir vasculaire
	CGU
	REA MED HC



Cette note confirme le **rôle central des laboratoires de bactériologie**. La DHOS et la DGS estiment que ces laboratoires « doivent être à même d'organiser rapidement (de préférence dans les 48 h) l'identification de l'espèce et la confirmation de la résistance à la vancomycine de toute souche d'entérocoque de comportement suspect vis-à-vis des glycopeptides (en référence au communiqué du CA-SFM 2006, tableau XI) ». Il est précisé que « les laboratoires qui ne sont pas à même de procéder eux-mêmes rapidement aux tests nécessaires (par exemple l'identification du gène *vanA* par méthode moléculaire) doivent passer un accord préalable avec un autre laboratoire géographiquement proche et prêt à assurer le travail dans les délais ci-dessus dès la survenue d'une alerte ». C'est à l'occasion de cette note que s'est engagée une réflexion au sein du laboratoire de bactériologie sur les techniques adéquates et adaptées à mettre en place dans le cadre du dépistage des ERG : nature du milieu d'isolement, utilisation d'un bouillon d'enrichissement ou non, méthode de PCR multiplex ou temps réel. Cette partie plus à proprement parlé bactériologique sera détaillée dans la 3^{ème} partie expérimentale.

La prévention de l'émergence des épidémies à ERG dans les établissements passe, selon cette fiche technique opérationnelle publiée par DGS/DHOS, par 3 étapes (texte intégral Annexe 4) :

- Etape 1 : Evaluation de la situation dès l'alerte donnée
- Etape 2 : Mesures à mettre en place dans les 2 jours suivants (liste patients contact, enquête portage fécal, recherche de cas suspects plus anciens...)
- Etape 3 : Mesures à appliquer tout au long de l'épidémie, en plus des précautions « standard » et « contact »

En janvier 2007, le CHUN est à l'étape 3. Le principal problème reste alors la création à la fois d'un secteur pour héberger les patients ERG+, mais aussi un secteur dit « contact » pour les patients qui auraient éventuellement été en contact avec des patients identifiés comme porteurs. Si un ou des

secteurs sont créés, cela implique que le seul devenir possible des patients qui y sont hébergés est le retour à domicile.

De plus, si de tels secteurs sont ouverts, compte tenu du fait que nombre de patients concernés par l'épidémie sont des patients âgés, fragiles et dépendants, le plus souvent incapables de retourner à leur domicile, ces secteurs d'isolement risquent de rester ouverts plusieurs mois, voire années, embolisant matériel et personnel dédiés. De plus, cela engage à la fois le CHUN et ses patients, mais aussi le système de santé lorrain dans son ensemble, puisque de tels secteurs devraient aussi accueillir des patients extérieurs au CHUN.

Une nouvelle dimension est aussi à prendre en considération : les **potentiels effets néfastes de telles mesures sur les patients**. La plupart vivent en effet très difficilement l'isolement, qui a par ailleurs un effet sur la prise en charge présente (réticences du personnel soignant) et sur leur devenir. Comme souligné ci-dessus, le seul choix offert aux patients ERG+ est le retour à domicile, mais même les familles deviennent réticentes à une prise en charge après dépistage positif.

✱ Etat des lieux mi-février 2007

Au total, **52 sujets porteurs ont été identifiés (45 colonisations et 7 infections)**. Quatorze patients sont décédés ; **deux décès sont imputables à la présence d'ERG (une endocardite et un choc septique)**. Parmi ces patients, 25 étaient encore hospitalisés au CHUN :

- 1 en secteur de transplantation médullaire (*E. faecium vanA* mais différent de la souche épidémique) ; une campagne de dépistage est prévue.
- 1 en hématologie adulte (*E. faecium vanA* mais différent de la souche épidémique)
- 18 au secteur 2 de médecine B (secteur de cohorting)
- 3 en pneumologie
- 2 en chirurgie vasculaire (dont 1 cas probablement en provenance de la dermatologie, une campagne de dépistage est prévue en conséquence dans ce service).

Parmi les autres patients porteurs, 24 sont retournés à domicile, 9 sont hébergés dans des maisons de retraite ou services de long séjour, 2 en Centre Hospitalier hors CHU. Au moins 4 patients présentent une souche différente de la souche épidémique. **Devant la multiplicité des souches dépistées, il est décidé de réaliser une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour toute souche provenant de services non touchés par l'épidémie.**

Des réunions sont organisées avec la DGS, DHOS, InVS, ARH, DRASS, DDASS, CCLIN Est et CRH, à l'issue desquelles cinq mesures principales sont adoptées :

① pas de transfert des patients porteurs vers des unités de court séjour ou des services de rééducation.

② sortie possible vers : domicile, maisons de retraite ou long séjour, mais en assurant une transmission et une traçabilité de l'information concernant l'existence d'un portage ou d'une infection à ERG. Dans ce cadre, trois documents ont été rédigés : fiches de traçabilité, transfert patient et fiche de liaison (cf. Annexes 5,6,7).

En ce qui concerne les prélèvements réalisés à la sortie, et compte tenu des difficultés rencontrées pour le placement des porteurs ne nécessitant plus de soins, diverses décisions ont été prises les concernant :

- **soit un patient n'est pas reconnu comme porteur lors de son hospitalisation au CHUN**
- ➔ prélèvement en tant que sujet contact : négatif
- ➔ absence de prélèvement car pas de facteur de risque ou de contact avec un patient porteur

Le patient peut sortir comme tout patient avant l'épidémie.

- **soit un patient est dépisté et connu comme porteur lors de son hospitalisation, et quel que soient les résultats des dépistages ultérieurs, il reste considéré comme porteur.**

➔ Le patient ne peut en ce cas sortir qu'avec l'aval de la CRH et vers une structure capable de l'accueillir en chambre seule, et en respectant les précautions standards d'isolement entérique.

③ **Création d'une deuxième unité de cohorting** (en plus de l'unité déjà créée en TD8 lors de la 1^{ère} vague de l'épidémie) : **secteur 2 du service de gériatrie**, étendue à 20 lits. Ces secteurs hébergent des patients porteurs ne nécessitant plus une prise en charge dans un secteur spécialisé, avec un personnel dédié qui ne travaille que dans ce secteur, avec une tenue spécifique (casaques vertes).

④ **Renforcement de la politique de dépistage**, afin de permettre l'économie de l'ouverture d'un secteur « contact », peu réaliste dans la situation endémo-épidémique à mi-février 2007.

⑤ **Une liste des patients porteurs** est mise en place sur le réseau intranet, consultable uniquement par certains professionnels de santé, à l'aide d'un identifiant et d'un mot de passe. Cette liste n'est ni enregistrable, ni imprimable. Cette liste est entrée en fonction à partir du 1^{er} février 2007. Un courrier en ce sens a été envoyé aux médecins et aux cadres infirmiers. Le problème s'est évidemment posé de la confidentialité d'une telle information. Mais compte tenu de l'importance que revêt le fait de mettre ces données à disposition des soignants réalisant les admissions, la DHOS a indiqué que la mise en commun de cette information était envisageable dans le cadre du secret partagé.

Cependant, divers problèmes, en particulier éthiques, de prise en charge des patients, se posent :

- certains patients porteurs ne nécessitant plus de soins ne peuvent retourner à leur domicile (dépendance psychique ou physique, refus des familles, résidant déjà en maison de retraite avant leur hospitalisation) et séjournent actuellement au CHU, embolisant le secteur de cohorting ;
- la situation d'isolement est mal comprise, voire mal vécue, par les patients et leurs familles ;
- des problèmes éthiques sont liés à cet isolement, en particulier pour les patients âgés et s'il est prolongé.

✱ Etat des lieux mi-mars 2007

La situation demeure préoccupante. La gestion de l'épidémie est difficile : plus d'une trentaine de patients porteurs sont hospitalisés au CHU, répartis dans différents services. Ce nombre est très supérieur à la capacité d'accueil de l'unité de cohorting. Certaines données sont tout de même encourageantes à ce stade de l'épidémie :

- le cohorting en Médecine B et en Pneumologie est efficace,
- les dernières enquêtes de prévalence ont montré l'absence de nouveaux positifs dans les services de Dermatologie, CGU et Maladies Infectieuses.

Au total depuis fin 2004, 258 cas ont été identifiés, 92 depuis la reprise du phénomène épidémique à l'automne 2006.

3.1.2. Avril 2007 : Mission d'évaluation épidémiologique et des actions développées

Une mission d'appui a été envoyée au sein du CHUN les 2 et 3 avril 2007, à la demande du Ministère de la Santé, afin d'évaluer la situation sur le plan épidémiologique et d'évaluer les actions développées pour faire face à ce phénomène. La mission comptait 5 membres, tous experts extérieurs à notre région (médecin hygiéniste, épidémiologiste, bactériologistes, cadre de santé). La mission a rencontré à la fois :

- les principaux acteurs impliqués dans la gestion de l'épidémie : Direction Générale, Direction des Soins, CLIN, EOHH, laboratoires de bactériologie et d'hygiène, ainsi que l'ARH, la DRASS, le CCLIN Est et la CRH.
- les équipes de soignants impliqués dans la gestion quotidienne des patients porteurs : les deux services de cohorting, réanimation, néphrologie, dialyse, services de moyen et long séjour.

Les conclusions de cette mission ont été les suivantes :

- le rôle essentiel de la CEA a été souligné, en particulier son caractère multidisciplinaire, le taux de participation élevé aux réunions, ainsi que la présence des instances de l'établissement.
- le caractère indispensable et la réussite des stratégies de cohorting ont été mis en évidence.
- **MAIS** toutes ces stratégies de prévention ont été développées **a posteriori**. Cela signifie que l'épidémie a toujours de l'avance et qu'il est plus qu'urgent de réfléchir à des stratégies anticipatoires. Il apparaît par ailleurs nécessaire de réaliser une enquête de prévalence dans tous les services du CHUN.

Des audits des pratiques d'Hygiène sont réalisés à la demande des instances de tutelle, afin d'évaluer l'efficacité des mesures mises en place (utilisation des SHA, double décontamination des chambres des patients porteurs...). Les résultats de ces audits sont détaillés paragraphe 3.2.

Alors qu'un peu d'optimisme semble souffler sur le CHUN (conclusions positives de la mission de Tutelle, diminution du nombre de patients dépistés ERG+), 2 nouveaux cas sont dépistés en dehors du CHUN : un à la Clinique de Traumatologie-Orthopédie de Nancy, un au Centre de Lutte contre le Cancer Alexis Vautrin (CAV) à Vandœuvre. Ces patients n'ont aucun antécédent d'hospitalisation au CHUN dans un service à risque ERG, voire aucun antécédent d'hospitalisation. Une enquête de prévalence concernant tous les services du CHUN est débutée dernière semaine d'avril.

Ainsi, 314 patients ont été dépistés depuis octobre 2004, dont 148 depuis le 1^{er} août 2006.

3.1.3. A partir de mai 2007 : un début de maîtrise de l'épidémie ?

L'enquête de prévalence réalisée fin avril-début mai n'a pas mis en évidence de nouveau patient porteur, ce qui semble rassurant quant à la maîtrise de l'épidémie. Un seul bémol à cette touche plutôt positive : une nouvelle phase épidémique semble prendre de l'ampleur en Médecine B1 (Gériatrie), avec la survenue de 9 cas en 3 semaines. Une action de recadrage des pratiques a immédiatement été

entreprise : audit d'observance d'hygiène des mains, audit des pratiques de bionettoyage, audit des pratiques d'hygiène durant la toilette des patients.

Une recrudescence du nombre de cas positifs est observée dans les établissements hors CHUN. Il semble qu'une diffusion des ERG soit en cours à l'échelle de la Lorraine... Et les établissements touchés ne bénéficient pas toujours des moyens d'isolement et de cohorting, faisant craindre, une nouvelle fois, une embolisation des secteurs de cohorting du CHUN.

Trois nouveautés sont à signaler en juin 2007 : une patiente porteuse d'un *E. gallinarum vanA* a été dépistée au CAV, ainsi qu'un patient porteur *E. faecalis vanA*, hospitalisé en secteur de cohorting du fait du risque de transmission du transposon *vanA*. Ainsi qu'une souche *E. faecium vanA* présentant un phénotype de résistance aux antibiotiques sensiblement différent de la souche épidémique : sensible à l'ampicilline. Ces 3 cas sont pour l'instant isolés mais sous surveillance, par crainte de l'éventuelle diffusion d'un autre clone.

Fin août 2007, l'épidémie semble être en voie de régression...

3.2. Evaluation des pratiques en Hygiène, enquête réalisée par la CRH et l'EOHH du 26 mars au 12 avril 2007

Suite à la recrudescence d'apparition de nouveaux cas de colonisations/infections à ERG depuis fin 2006, face à la difficulté de gestion de cette nouvelle épidémie et aux cas de décès imputables à la présence d'ERG, le CCLIN Est et la CRH ont encouragé la réalisation d'une évaluation macroscopique et transversale des pratiques d'hygiène, sur l'ensemble des services du CHUN, afin de répondre à la demande de la Tutelle. Ces nouveaux audits ont été réalisés le 15 avril 2007. Compte tenu du faible délai imparti, seuls les items suivants ont été retenus :

- respect des précautions standard d'hygiène des mains (note sur 6),
- utilisation des SHA (note sur 2),

- respect des précautions renforcées (« isolement ») (note sur 6),
- respect des précautions standard et des protocoles du CHUN (note sur 6).

L'objectif de cette nouvelle enquête était de mettre à jour les éventuelles défaillances pouvant être à l'origine de transmissions croisées des ERG, directement de patient à patient, où par manuportage (mains du personnel soignant, mobilier des chambres). Ces évaluations ont concerné à la fois infirmières, aides-soignantes, ASH, kinésithérapeutes, médecins, ou tout autre soignant intervenant auprès des patients.

Les services audités au sein du CHUN ont obtenu en moyenne une note de 12,6/20. Cela indique que les précautions d'hygiène sont respectées, ainsi que l'isolement, mais que la marge de progression est encore importante. Cependant, le niveau d'information et de connaissance du risque de transmission des ERG reste très variable d'une équipe à l'autre. Et il persiste encore des réticences à l'utilisation des SHA (en terme de tolérance, d'efficacité). Quels sont les points à améliorer :

① Utilisation des SHA : cette utilisation reste très variable selon les services. Ceux ayant déjà bénéficié de la formation par l'EOHH ainsi que ceux ayant déjà accueilli des patients ERG+, les utilisent beaucoup plus volontiers (meilleure sensibilisation).

② Bon usage des gants en fonction des tâches à accomplir : le port des gants n'est en général ni précédé ni suivi d'une action d'hygiène des mains, et semble davantage être considéré comme protection du soignant, que comme barrière à la transmission croisée des microorganismes.

③ Elimination du port des bijoux

④ Améliorer le port de surblouse ou de tablier pour certains soins (nursing, entretien de l'environnement, distribution des repas)

⑤ Réorganisation des modalités d'entretien des sanitaires : les gants ne sont pas changés ni ôtés après le nettoyage des toilettes et sont conservés jusqu'à la sortie de la chambre... *quid* des poignées de porte et des interrupteurs...

⑥ Revue des modalités de décontamination en cas de levée de l'isolement septique : la notion de double désinfection semble floue pour certaines équipes... Ainsi que le temps d'attente entre les deux désinfections.

3.3. Conclusions sur l'évolution de cette 2^{ème} épidémie

En conclusion, l'évolution de cette 2^{ème} vague de l'épidémie (novembre 2006 – septembre 2007) a variée selon les services au sein du CHUN, et à une échelle plus importante, a touché successivement les différents établissements de soins de la région Lorraine. Les différents éléments d'évolution épidémiologique sont présentés Figures 31 à 36.

Au 1^{er} novembre 2007, 558 patients ont été dépistés ERG+ depuis le début de l'épidémie, fin 2004 : 387 au CHU de Nancy (69%), 171 dans d'autres établissements lorrains (31%). Parmi les patients porteurs, 145 (26%) sont décédés, mais seuls deux décès sont imputables à la présence d'ERG (une endocardite, un choc septique). La moyenne d'âge est de 73 ans (20-102 ans), la médiane 77 ans. Le sexe ratio est de 0,84 (54,1% de femmes, 45,9% d'hommes). La Figure 31 rappelle l'évolution de l'incidence depuis octobre 2004.

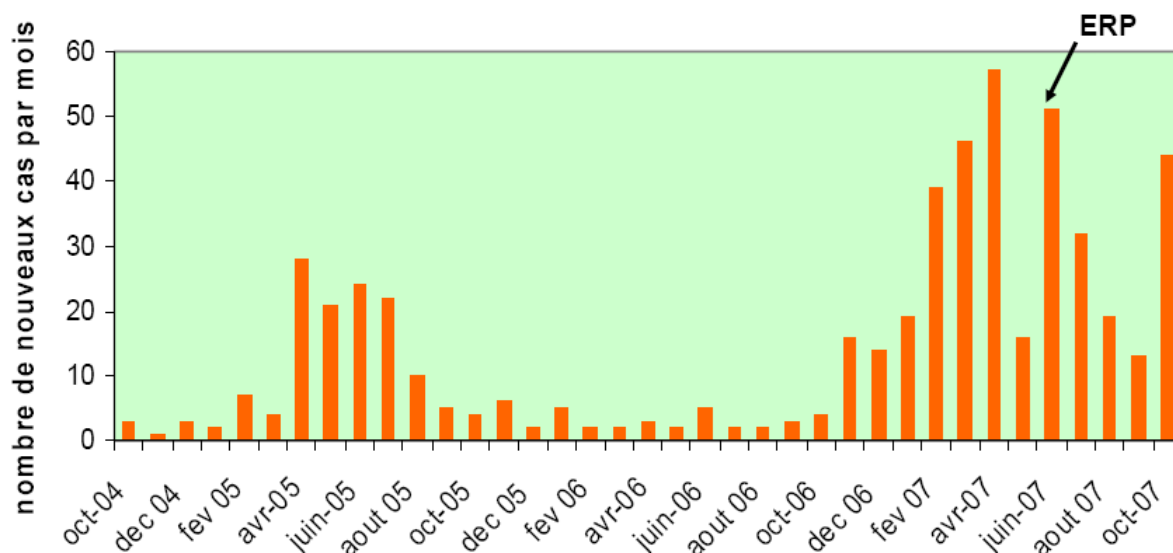


Figure 31 : Evolution de l'incidence en Lorraine, entre octobre 2004 et octobre 2007.

ERP : Enquête régionale de prévalence.

▣ Epidémiologie hors CHUN

Ainsi, différents types d'établissements ont été touchés : polycliniques, centres hospitaliers, maisons de retraites, centres de soins de suite et de réadaptation. Les patients porteurs ERG+ les plus nombreux ont été dépistés à la Clinique de Traumato-orthopédie, au CAV et à la maison de retraite de Pompey (Figure 32). Ces patients ont été ou non hospitalisés au sein du CHUN, que ce soit ou non dans des services connus à ERG, sans qu'un lien réel n'ait pu toujours être établi. Ce sont en tout cas généralement des patients dits à risque car fragilisés (personnes âgées, sous chimiothérapie, en convalescence post-opératoire).

L'évolution de l'incidence depuis le 1^{er} janvier 2007 dans les établissements de soins lorrains hors CHU est représentée Figure 33. A noter les différents pics d'incidence lors des enquêtes de prévalence (post-passage de la mission d'appui, enquête régionale de prévalence), ainsi que l'augmentation actuelle. Cela peut s'expliquer par le fait que pendant longtemps, le portage d'ERG n'a pas été dépisté dans les établissements hors CHUN, permettant leur dissémination par l'exportation et le transfert de

cas non détectés depuis octobre 2004... La mise en place d'un dépistage efficient a probablement commencé à faire apparaître la face cachée de l'iceberg...

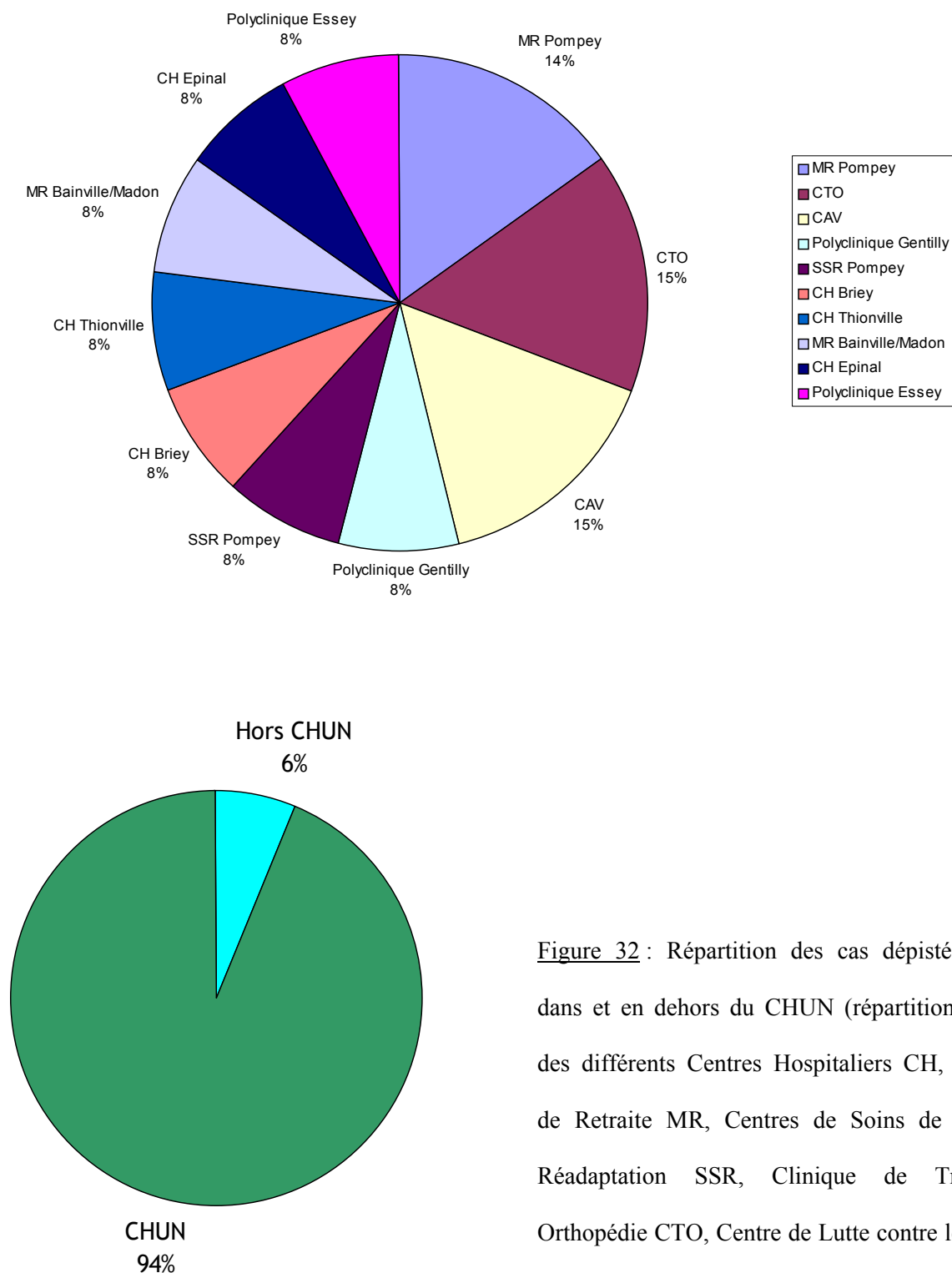


Figure 32 : Répartition des cas dépistés ERG+ dans et en dehors du CHUN (répartition au sein des différents Centres Hospitaliers CH, Maisons de Retraite MR, Centres de Soins de Suite et Réadaptation SSR, Clinique de Traumatologie Orthopédie CTO, Centre de Lutte contre le Cancer Alexis Vautrin CAV, et polycliniques).

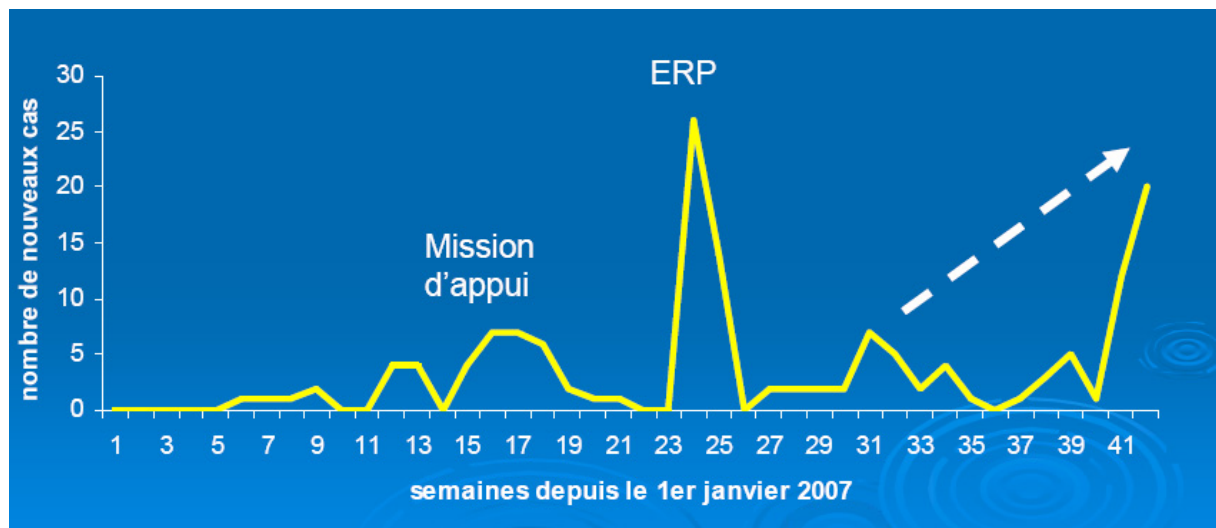


Figure 33 : Evolution de l'incidence des ERG en Lorraine, hors CHUN.

Comment savoir s'il s'agit d'une transmission du clone « Nancy » ou de clones locaux comme cela a été le cas à Thionville ?

Nous prendrons l'exemple de 6 souches de *E. faecium vanA* isolées à Vittel et d'une souche isolée à Lunéville. Le pulsotypage par PFGE nous a ainsi permis de montrer :

- (i) les souches isolées chez 4 patients présentaient des pulsotypes ne différant entre eux que par une bande, mais différant de plus de 7 bandes de la souche épidémique du CHUN. Cela signifie qu'il existe probablement un lien épidémiologique temporelle et/ou spatiale entre ces patients, mais que cette dissémination n'a pas pour origine le CHUN, mais plutôt une apparition locale sous pression de sélection (clone « Vittel » n°1).
- (ii) une des souches diffère de plus de 7 bandes à la fois des autres souches « Vittel » et de la souche épidémique du CHUN (clone « Vittel » n°2).
- (iii) une des souches isolée à Vittel est similaire à celle de Nancy, le patient ayant effectué un séjour au CHUN.
- (iv) La souche isolée à Lunéville diffère de toutes les autres souches isolées (clone « Lunéville »).

Cet exemple nous montre qu'il est indispensable de réaliser un pulsotypage des souches, afin d'affirmer le lien épidémique, et de mettre à jour l'émergence d'autres clones, liés à une pression de sélection locale, chez des patients fragilisés (dialysés chroniques et long séjour dans ce cas).

L'épidémie de Thionville, quant à elle, s'est déroulée en deux phases, touchant principalement les services de Réanimation. Le pulsotypage a permis de mettre en évidence l'existence de deux clones distincts. Le 1^{er} clone est celui responsable de l'épidémie régionale (clone « Nancy »), ayant touché 3 patients de Thionville (2 transférés du CHUN, une transmission croisée). Le 2^{ème} clone est resté spécifique au CH de Thionville (clone « Thionville »), retrouvé chez 5 patients en réanimation, dont le cas index était un patient dialysé.

▣ Epidémiologie au sein CHUN

Concernant les services du CHUN, depuis le début de l'épidémie fin 2004, l'Hôpital de Brabois Adultes reste le plus touché, avec un maximum de dépistage dans les services suivants : néphrologie (en comptant la dialyse), HGE, gériatrie (médecine B)... Services auxquels on peut ajouter pour l'épidémie 2007 la chirurgie vasculaire et la médecine H (service localisé sur le site de l'Hôpital Central) (Figure 34). Malgré une détection précoce du regain de l'épidémie en novembre 2006, lors des 1^{ers} cas dépistés en néphrologie, et signalés par le laboratoire de bactériologie, les moyens et mesures mis en place n'ont hélas pas permis d'enrayer totalement l'épidémie. Le pic de l'épidémie s'est situé en mars 2007, et le nombre de cas a ensuite progressivement diminué (Figure 35). Une légère augmentation est à noter depuis fin juillet 2007. Cela demeure cependant peu inquiétant, cette recrudescence étant liée à des cas isolés en Cardiologie Transplantation et Réanimation (en passe de résolution par une réorganisation des pratiques de soins et d'hygiène des mains). Depuis juillet 2007, le nombre de patients porteurs à leur sortie du CHUN diminue (diminution du nombre de colonisations acquises au cours d'une hospitalisation au CHUN, donc maîtrise du phénomène), et la proportion de patients positifs à leur entrée augmente (patients provenant d'autres établissements lorrains, et ayant acquis leur ERG hors CHUN) (Figure 35). Cela tend à prouver l'efficacité des mesures mises en œuvre au CHUN, et le manque d'expérience et de recul des autres établissements, expliquant la nécessité de poursuivre les missions régionales.

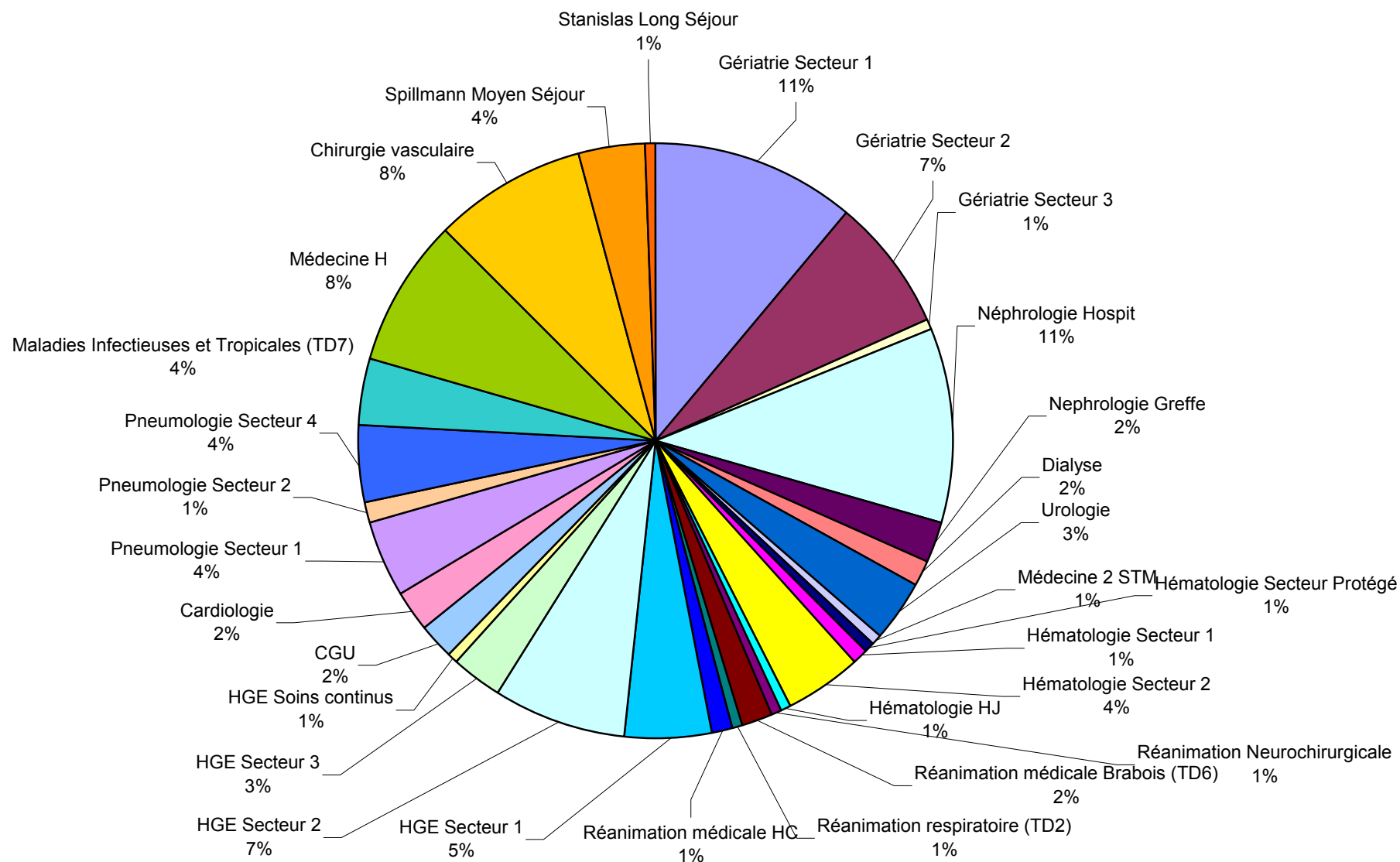


Figure 34 : Répartition des cas dépistés ERG+ au sein des différents services du CHUN (HGE : Hépto-Gastro-Entérologie ; CGU : Chirurgie digestive et Générale ; STM : Secteur de Transplantation Médullaire). Bilan au 3 août 2007 – Cas dépistés depuis le 1^{er} août 2006.

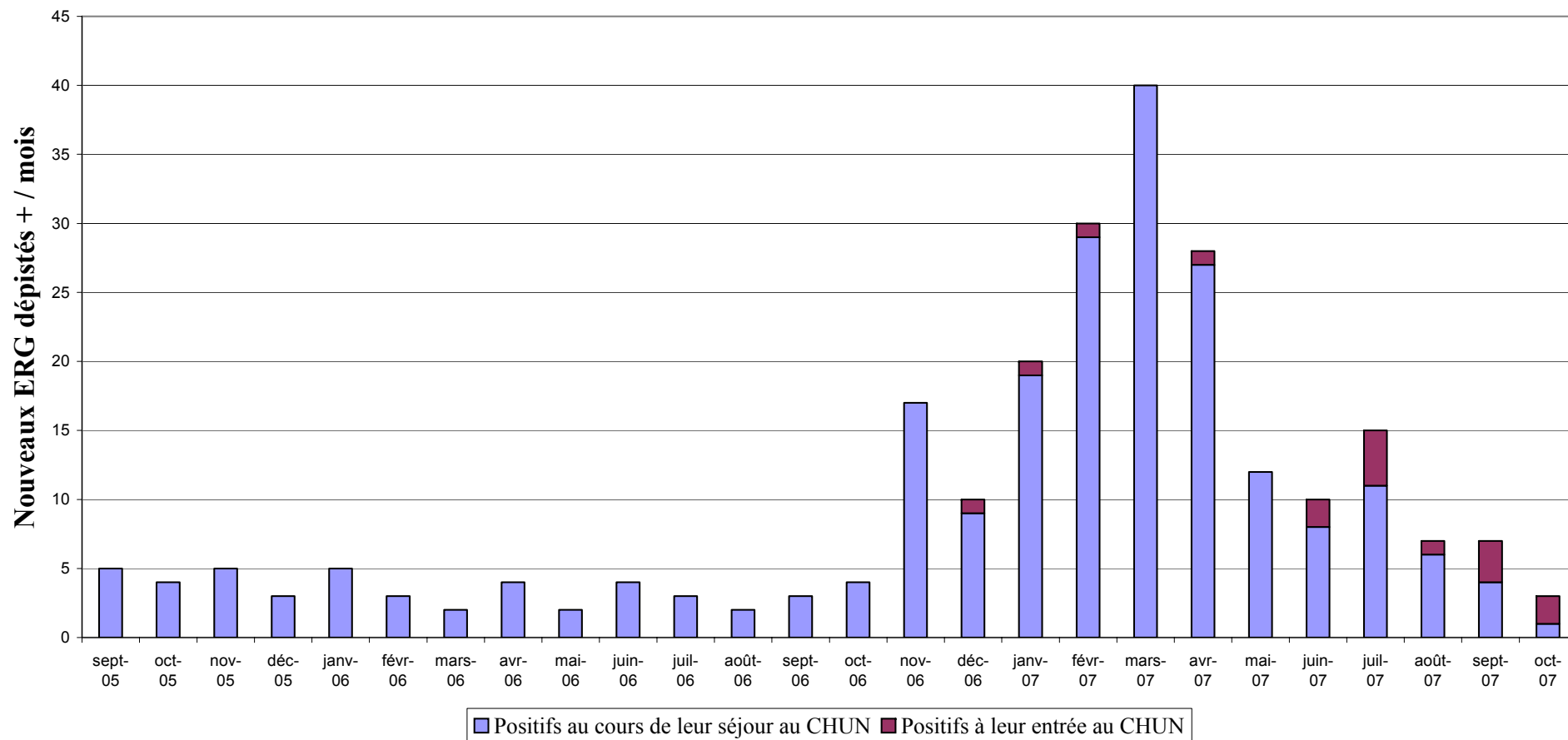


Figure 35 : Histogramme d'évolution du nombre de patients dépistés ERG+ depuis septembre 2005 (d'après le rapport hebdomadaire de l'EOHH, daté du 01 novembre 2007).

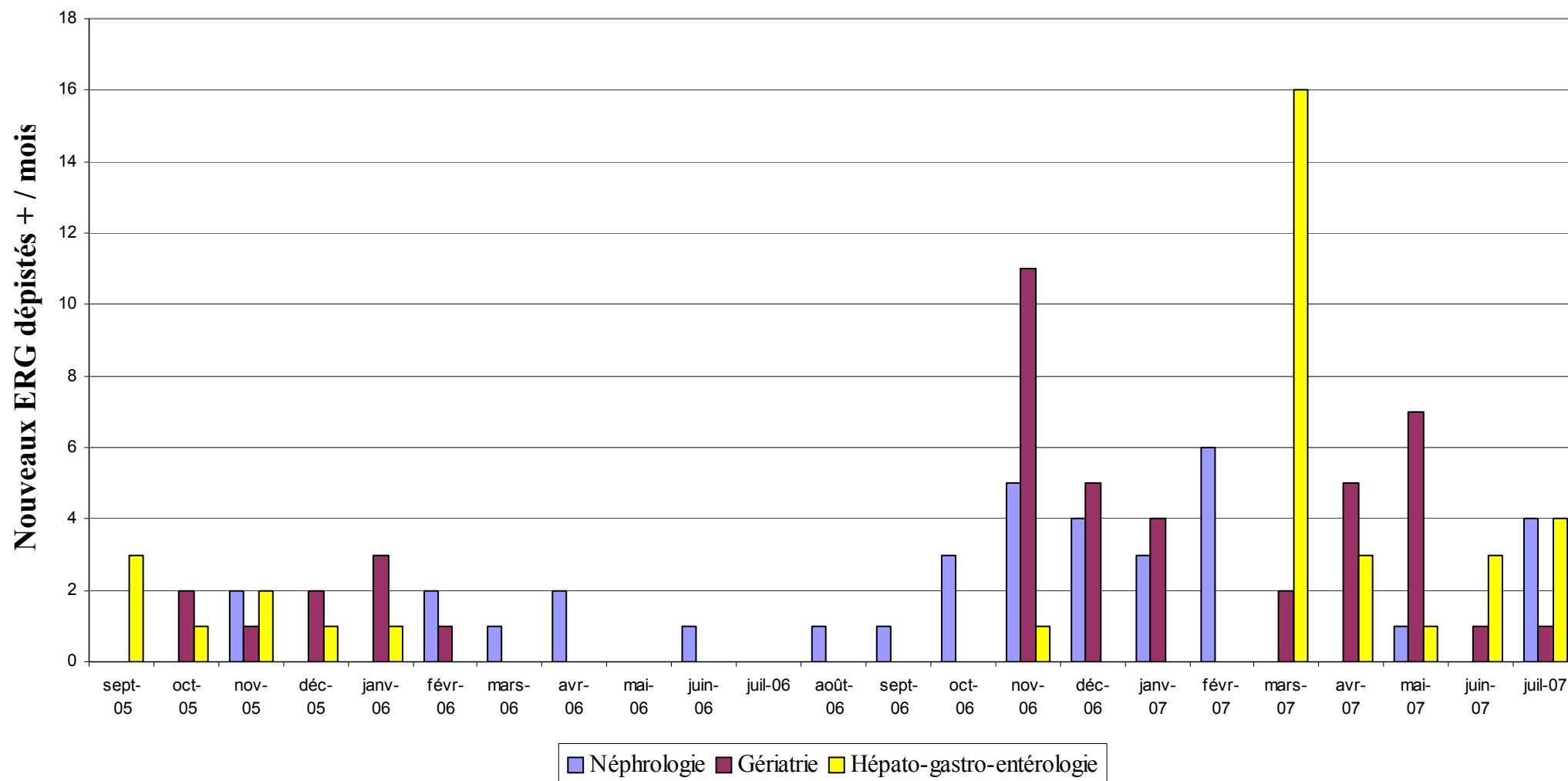


Figure 36 : Evolution du nombre de patients porteurs dépistés dans différents services du CHUN, depuis septembre 2005 : Néphrologie/Dialyse, HGE, Gériatrie (Médecine B).

Au sein du CHUN, selon les services, le pic épidémique n'a pas eu lieu au même moment (Figure 36). Le service de néphrologie semble rester (hélas) le réservoir des ERG avec une absence de disparition totale des nouveaux cas dépistés, et des pics sporadiques (novembre 2006, février 2007, juillet 2007). L'évolution est assez similaire en gériatrie, avec une flambée en novembre 2006, et une recrudescence en mai 2007. Les cas semblent plus sporadiques en HGE, avec cependant un pic épidémique en mars 2007.

CONCLUSION

Cette nouvelle vague de l'épidémie doit nous apprendre plusieurs choses :

① L'importance de maintenir en permanence un système de veille, en particulier concernant les ERG isolés de prélèvements à visée diagnostique. Cette vigilance a permis, très certainement, de diminuer le nombre de nouveaux cas lors de cette nouvelle vague. Le service de néphrologie étant le principal réservoir, une attention toute particulière doit être portée aux ECBU issus de ce service.

② L'importance du maintien permanent des mesures d'hygiène des mains, et de précautions lors de soins ou du nettoyage des chambres. C'est en effet un élément clé du contrôle de la dissémination des ERG, d'un patient à l'autre, d'un patient au personnel soignant. C'est à ce niveau que des efforts doivent être faits, pour que certains gestes ou attitudes (parfois résultant d'une simple question de bon sens) deviennent systématiques. Nous avons bien remarqué que les différents pics de dépistage de nouveaux cas étaient liés à un relâchement dans ces mêmes pratiques. Cela passe par une éducation du personnel soignant, à tout niveau ; ainsi, la plupart des études ont montré que les plus mauvaises pratiques étaient généralement attribuables aux médecins...

③ L'importance des procédures d'isolement et de cohorting. Ainsi que nous l'avait déjà montré l'exemple du Kremlin Bicêtre à Paris, ce sont ces deux mesures qui permettent d'enrayer rapidement les épidémies. Leur mise en place dans les délais les plus brefs, mais aussi leur maintien dans le temps sont donc essentiels.

④ L'importance du dépistage des patients porteurs, dans les meilleurs délais, et par des techniques sensibles et spécifiques. Cela sera discuté plus avant dans la 3^{ème} partie expérimentale.

Un bilan temporel de l'évolution de l'épidémie depuis octobre 2004 est présenté Figure 37.



Figure 37 : Bilan de l'évolution de l'épidémie depuis fin 2004. Nombre de cas dépistés ERG+, principaux services touchés et événements à signaler.

3^{ème} Partie

Sélection d'un milieu sélectif
chromogène dans un contexte
épidémique

Une détection rapide et fiable des ERG dans les selles ou les écouvillons rectaux est un élément clef du contrôle des épidémies d'ERG, indispensable à la mise en place de mesures de protection contact, de cohorting, et surtout à la transmission des gènes *van* aux SARM. La note de la DGS/DHOS a replacé, en ce sens, le rôle primordial des laboratoires de Bactériologie. Ceux-ci « doivent être à même d'organiser rapidement (de préférence dans les 48 h) l'identification de l'espèce et la confirmation de la résistance à la vancomycine de toute souche d'entérocoque de comportement suspect vis-à-vis des glycopeptides ».

Jusqu'à très récemment, la détection des ERG se faisaient grâce à des techniques classiques de culture sur milieu sélectif, utilisant les propriétés particulières des entérocoques. Le milieu le plus utilisé en routine jusqu'à présent était la gélose bile-esculine-azide, supplémentée avec 6 µg/mL de vancomycine. Alors que ces méthodes présentent une bonne sensibilité, la spécificité reste médiocre, et elles sont très consommatrices en temps technique et en matériel. La recherche des gènes *van* par PCR est avantageuse dans la mesure où elle permet le rendu des résultats dans un meilleur délai et la détection génotypique de résistances s'exprimant peu ou pas phénotypiquement. Mais ces techniques ne sont pas applicables en routine dans tout laboratoire, en terme de coût et de nombres d'échantillons à tester. Les progrès récents en terme de substrats chromogéniques, en association à des substances rendant les milieux sélectifs tout en permettant une bonne croissance des pathogènes à isoler, ont permis la mise au point de milieux chromogènes sélectifs que nous allons étudier et comparer dans ce chapitre.

Dans cette partie expérimentale, nous procéderons par étapes, suivant le fil des changements de protocoles de dépistage (milieux de culture, bouillon d'enrichissement) au gré des difficultés rencontrées. Nous avons, dans le cadre de cette épidémie et compte tenu des délais de rendu de résultats imposés par les instances dirigeantes, réalisé une évaluation de la spécificité et de la sensibilité de divers milieux chromogènes (VRE[®] de AES, chromAgar VRE[®] de Chromagar Laboratories et chromID-VRE[®] de bioMérieux), nous en présenterons le résultats. Nous concluons sur les conséquences du choix d'un milieu, avec ou sans une étape préliminaire d'enrichissement en bouillon, sur le nombre de PCR réalisées et la difficulté de leur interprétation.

Chapitre I : Rôle du laboratoire de bactériologie du CHUN dans les différentes étapes de l'organisation du dépistage

Les méthodes de détection varient en fonction du type de prélèvement :

- Pour les prélèvements à visée diagnostique (issus de sites infectieux) : une identification et un antibiogramme sont réalisées sur Vitek2 (bioMérieux). En cas de découverte d'une sensibilité diminuée à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, une PCR multiplex est réalisée.
- Pour les prélèvements à visée épidémiologique : la recherche d'un portage intestinal (écouvillons rectaux ou selles) est réalisée sur gélose sélective précédée ou non d'une phase d'enrichissement, puis par PCR multiplex. Dans le cas de coprocultures quantitatives, la procédure est la même que pour les prélèvements à visée diagnostique. Pour la surveillance de la colonisation du tractus urinaire, l'isolement se fait sur gélose CPS ID3 (bioMérieux) puis par détermination de la sensibilité vancomycine/teicoplanine par méthode de diffusion des disques sur gélose MH.

Ces techniques sont mises en place depuis le début de l'épidémie fin 2004. La distribution des prélèvements ERG+ entre colonisation et infection est présentée Figure 38. On constate que plus de 90% des ERG+ sont isolés dans les écouvillons réalisés à visée épidémiologique, et que peu d'infections à ERG+ ont été répertoriées sein du CHUN, quelque soit la période de l'épidémie.

Parmi les différentes espèces d'entérocoques, *E. faecalis* est la souche la plus souvent isolée dans les prélèvements à visée diagnostique (> 85% des cas), alors que paradoxalement, *E. faecium* semble plus réceptif à l'acquisition de gènes de résistance *van*, sans pour autant que cela s'accompagne d'une augmentation de la virulence de ses souches. Il est important et indispensable (i) non seulement de réaliser une parfaite identification d'espèce, mais aussi (ii) de faire la différence entre les *E. faecium* de phénotype sauvage (c'est-à-dire sensibles aux glycopeptides), et les souches porteuses d'un des gènes *van*.

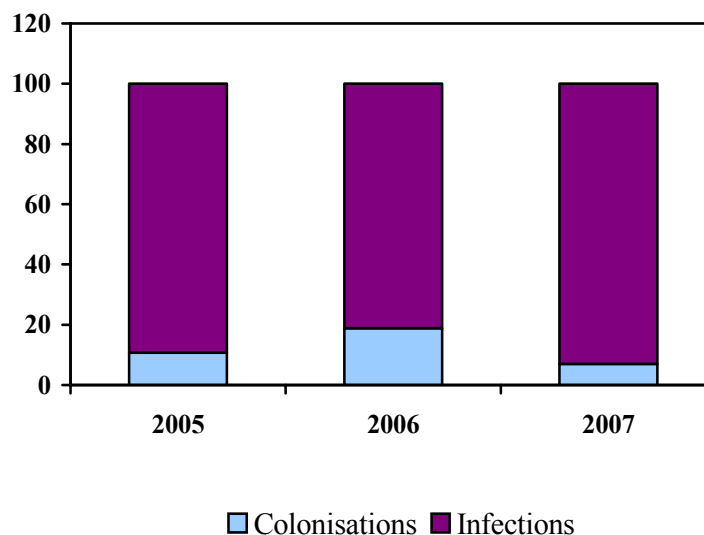


Figure 38 : Répartition des *E. faecium vanA* détectés en fonction du type de prélèvement, colonisation (visée épidémiologique) ou infection (visée diagnostique), en 2005, 2006 et 2007. Résultats exprimés en pourcentage du nombre total d'ERG détectés.

Parmi les entérocoques isolés lors des épidémies d'ERG en 2005 et 2006, environ 10% des entérocoques sont des *E. faecium*, et environ 2% des *E. faecium vanA* (Figure 39). Les prélèvements à visée diagnostique dans lesquels les ERG ont été isolés le plus fréquemment, sont les ECBU (en provenance, majoritairement de la Néphrologie), et les hémocultures (Figure 40).

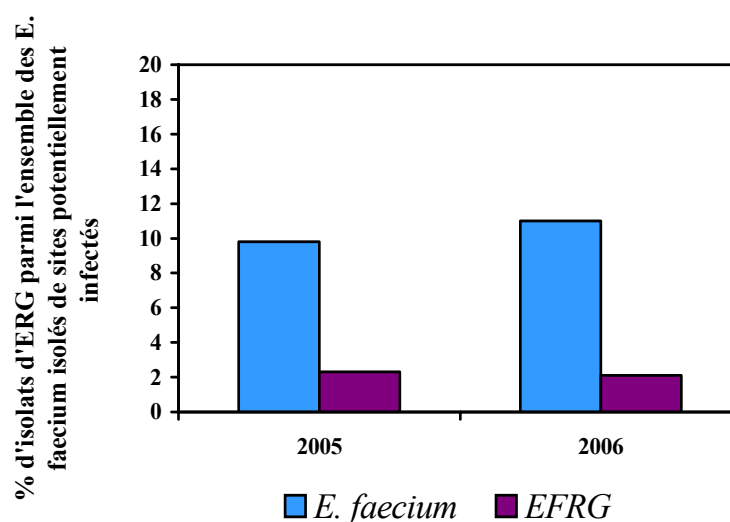


Figure 39 : Pourcentage, parmi l'ensemble des entérocoques isolés, de *E. faecium* et de *E. faecium* résistants aux glycopeptides (EFRG) isolés de sites potentiellement infectés.

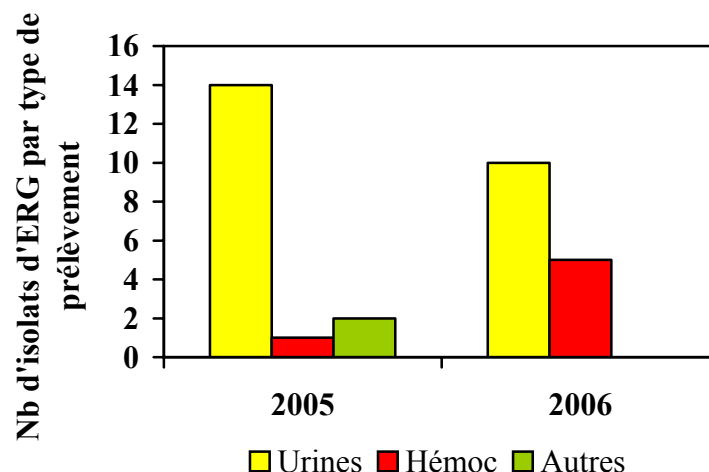


Figure 40 : Nombre d'isolats d'ERG répertoriés par type de prélèvement diagnostique.

La note DGS/DHOS de décembre 2006 a confirmé le **rôle central des laboratoires de bactériologie**.

Cela en appuyant sur deux points en particulier :

- (i) l'identification de l'espèce,
- (ii) la confirmation de la résistance à la vancomycine de toute souche d'entérocoque de comportement suspect vis-à-vis des glycopeptides,

tout cela dans les 48 h si possible (en tout cas dans les meilleurs délais).

Une réflexion s'est donc engagée dans notre laboratoire, afin de trouver une technique rapide, sensible et spécifique, permettant de mettre en place les procédures d'isolement et de cohorting dans les meilleurs délais.

Une des autres difficultés liées à l'organisation du CHUN, est l'existence de deux sites, géographiquement très distincts (Hôpital Central au cœur de la ville de Nancy, Hôpital de Brabois sur le plateau de Vandoeuvre-les-Nancy). Le laboratoire de bactériologie se situe à l'Hôpital Central, avec un détachement sur le site de l'Hôpital de Brabois. Cette « antenne » ne pouvant, par manque simple et évident de place, accueillir les écouvillons provenant de l'Hôpital de Brabois, il a été décidé, en collaboration étroite avec le service d'hygiène hospitalière, que l'ensemencement des écouvillons provenant des services de l'Hôpital de Brabois serait effectué au laboratoire d'hygiène. Les prélèvements sont ensuite pris en charge par les techniciens du laboratoire commun de Biologie

Moléculaire de Bactériologie et d'Hygiène (BMBH) (lecture à 24 et 48 h, réalisation des subcultures et de la PCR Multiplex). Sur le site de l'Hôpital Central, les écouvillons sont pris en charge par le Laboratoire de Bactériologie, et envoyés au laboratoire BMBH en cas de colonies suspectes.

Les différentes étapes du dépistage et modifications de protocole sont explicités ci-après.

A noter, quelle que soit la phase de dépistage :

En cas de dépistage d'un ERG, le résultat est systématiquement et rapidement communiqué par téléphone au service dans lequel le patient est hospitalisé, ainsi qu'à l'EOHH qui doit s'assurer de la mise en place des mesures spécifiques d'isolement et d'hygiène.

1.1. Phase 1 : Gélose BBL™ Enterococcosel™ (BD) jusqu'au 28/01/07

Dans les 1^{ers} temps de la reprise de l'épidémie, de novembre 2006 à fin janvier 2007, la technique utilisée est celle en place au laboratoire, en routine, pour la détection des ERG dans les selles, en dehors des phases d'épidémie. Les écouvillons sont ensemencés sur gélose Enterococcosel® contenant 6 µg/mL de vancomycine. Lorsque des colonies noires, caractéristiques, apparaissent, la souche est isolée sur gélose au sang en plaçant un disque de vancomycine en début d'isolement, et incubée 24 h à 35°C. Si la zone d'inhibition autour du disque est réduite ou absente, une coloration de Gram et une recherche de pyrrolidonyl arylamidase (PYR) sont réalisées. Pour les cocci à Gram +, PYR+, une identification et un antibiogramme sont effectués sur Vitek2. Lorsque les CMI à la vancomycine et/ou à la teicoplanine sont diminuées, une confirmation par PCR multiplex est réalisée. Avec ce protocole, le délai de rendu des résultats était de :

- 2-3 jours pour les cultures négatives
- 4-5 jours pour les cultures/PCR positives

Compte tenu que cela impliquait une mise en place d'un isolement probabiliste des patients à l'entrée, sur plusieurs jours, dans l'attente des résultats du portage, ce délai était beaucoup trop long.

La 1^{ère} modification de protocole a consisté en la suppression de l'étape «identification + antibiogramme Vitek2», avec envoi direct des souches résistantes à la vancomycine, pour confirmation en PCR multiplex. Cependant, le problème principal de la gélose Enterococcosel® est son manque de spécificité et de sensibilité. En effet, de nombreuses bactéries, autres que les ERG, poussent sur ce milieu (en particulier les entérocoques naturellement résistants, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*, et d'autres Gram +, *Pedicococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. ...). Ce manque de spécificité entraîne la réalisation de nombreuses PCR sur des colonies noires qui sont des bactéries autres que des ERG, ce qui entraîne un surcoût et une perte notable de temps technicien.

A la lecture de la circulaire DHOS –DGS, il nous est apparu indispensable de mettre en place une autre technique de dépistage.

1.2. Phase 2 : Changement de milieu → milieu chromogène VRE (AES Chemunex) : du 29/01/07 au 27/02/07

Le milieu VRE de AES était, courant décembre 2006, le seul milieu chromogène sélectif commercialisé, pour la détection des ERG, que ce soit sur selles ou sur écouvillons rectaux. Ce milieu contient 6 µg/mL de vancomycine, et les colonies d'ERG apparaissent bleu-vert (mise en évidence d'une β-glucosidase). C'est pour cela que nous l'avons choisi, et évalué fin 2006, pour une mise en place fin janvier 2007. Le protocole d'ensemencement des écouvillons rectaux (ER) était le suivant : ensemencement direct de la gélose VRE à partir de l'écouvillon, incubation 24-48 h à 35°C, puis envoi pour confirmation par PCR multiplex, des spécimens donnant des colonies bleu-vert. Les schémas de prise en charge des ER, sur les sites de Brabois et de Central, sont représentés Figures 41 à 43.

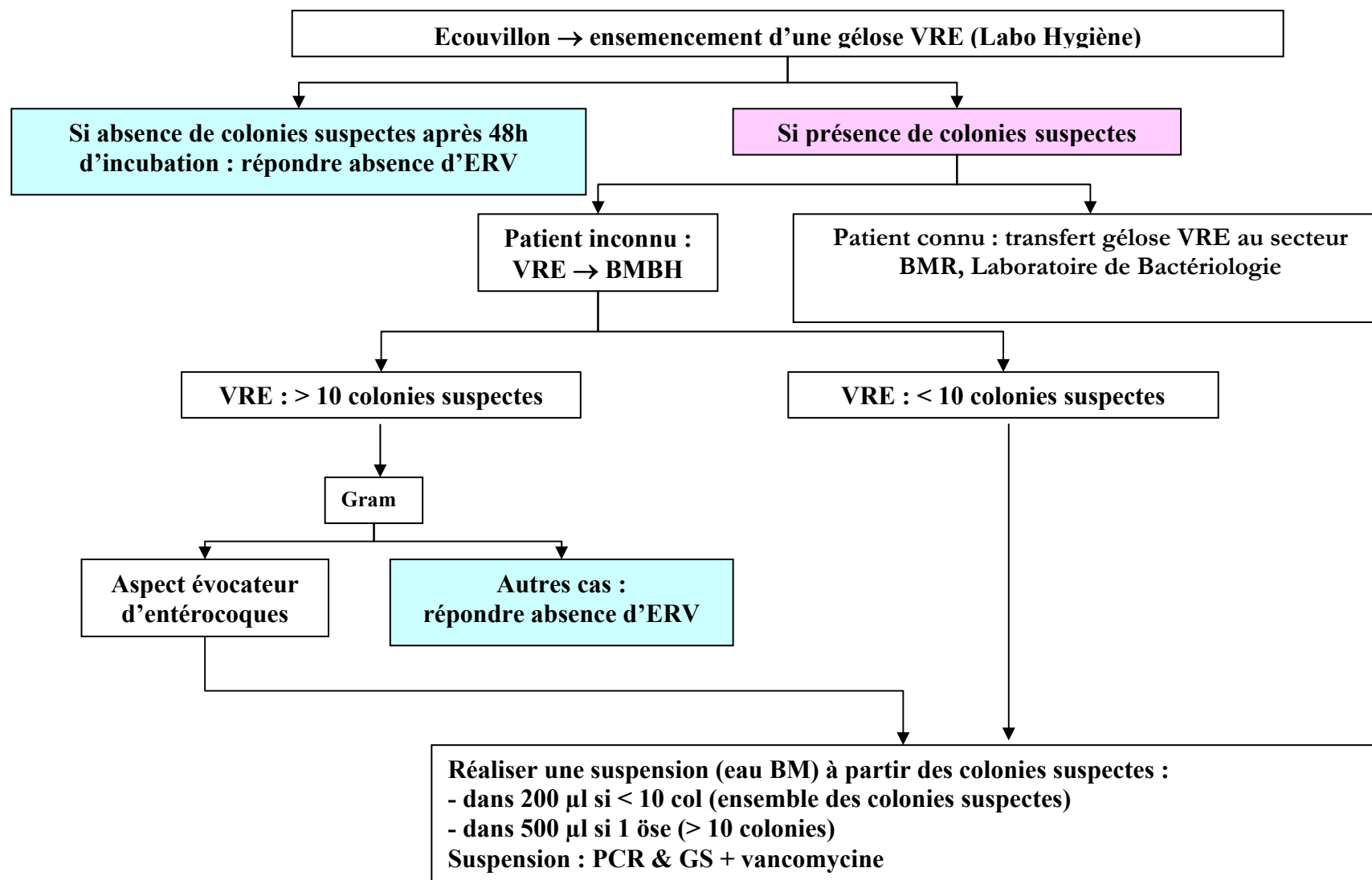


Figure 41 : Procédure d'ensemencement des écouvillons rectaux sur gélose VRE (AES). [Site de Brabois](#).

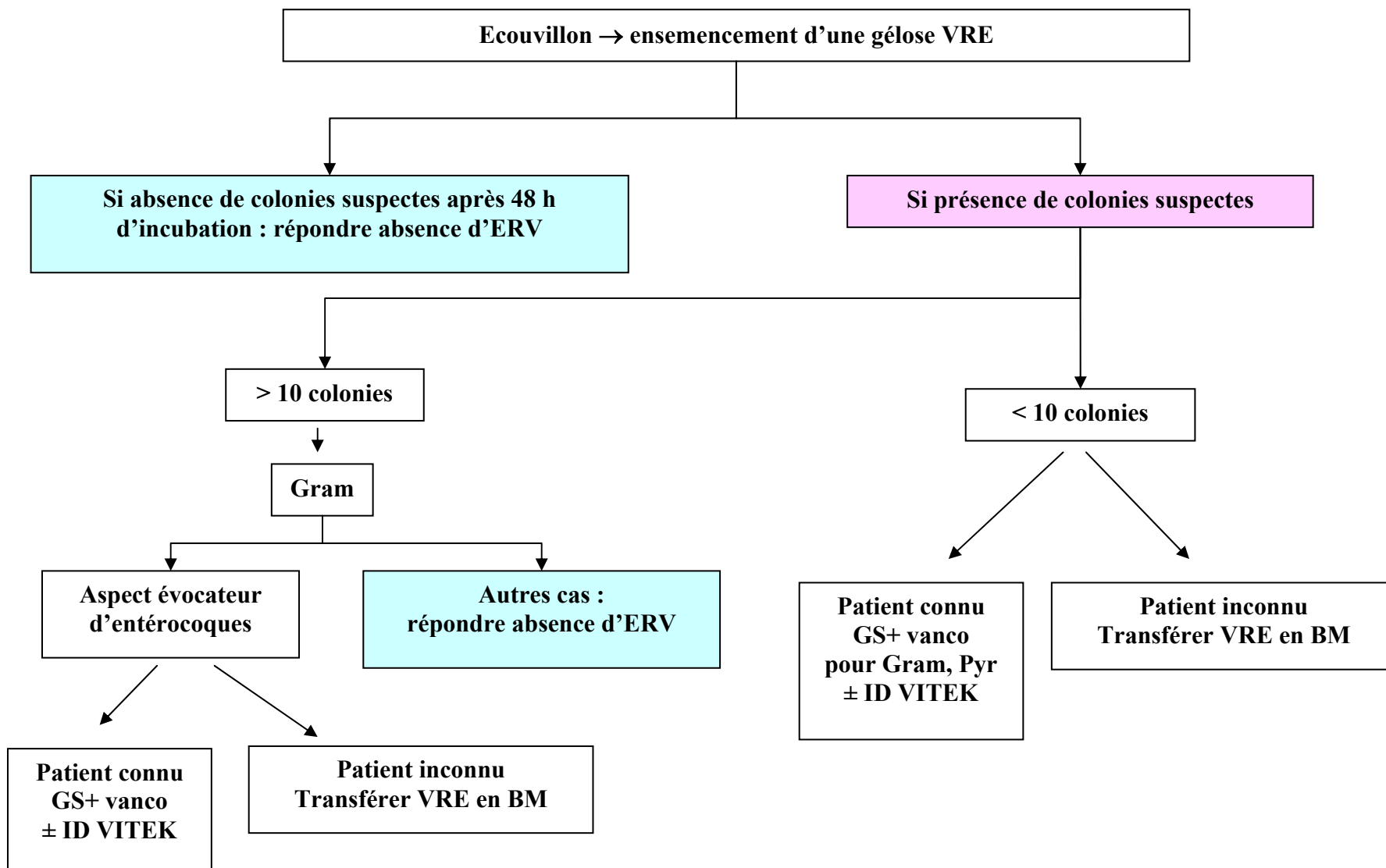


Figure 42 : Protocole d'ensemencement des écouvillons rectaux sur gélose VRE (AES). Site de Central.

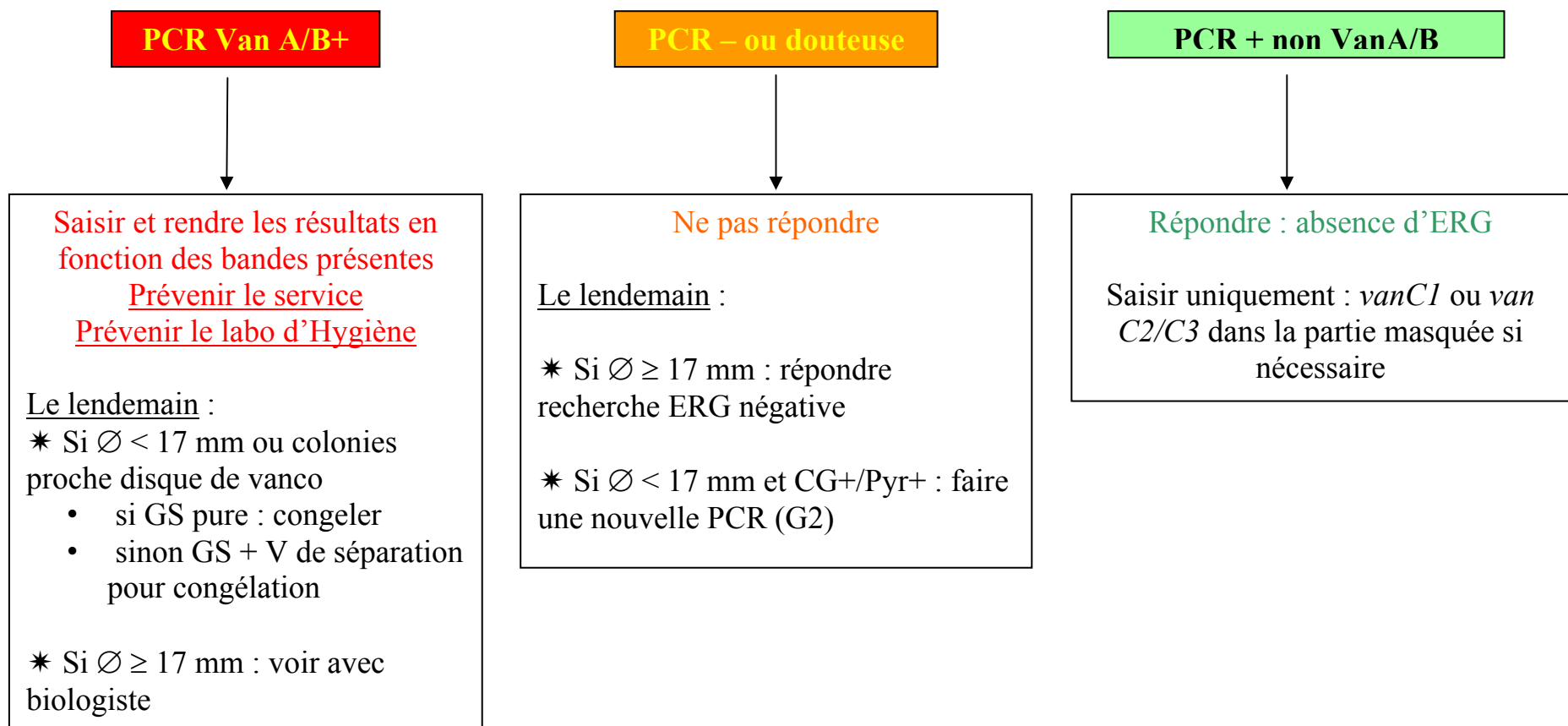


Figure 43 : Protocole d'identification de l'espèce et du phénotype de résistance par PCR Multiplex.

Procédure à suivre en fonction du résultat de la PCR : positive, négative ou douteuse.

L'objectif de cette 1^{ère} étape était de réduire le délai de réponse ; ce qui a été obtenu (Figure 44). Cependant, ce milieu chromogène ne permet pas une différenciation des différentes espèces d'entérocoques, et de nombreuses autres bactéries poussent (BGN, entérocoques naturellement résistants aux glycopeptides, CGP autres que entérocoques, levures...). Cela implique de même qu'avec le milieu Enterococcosel®, un nombre très important de PCR, non justifié.

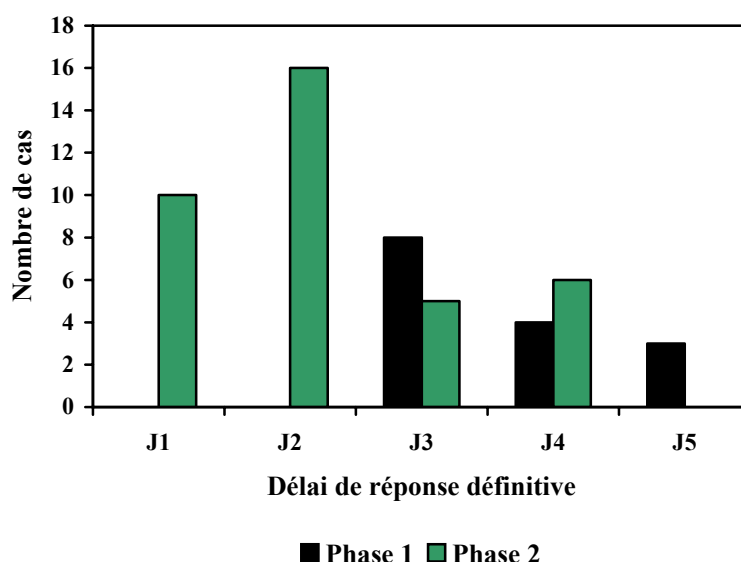


Figure 44 : Délai de réponse définitive lors des deux premières phases du dépistage des ERG à partir des écouvillons rectaux. Phase 1 : Gélose Entéroccoccosel ; Phase 2 : Milieu chromogène VRE (AES).

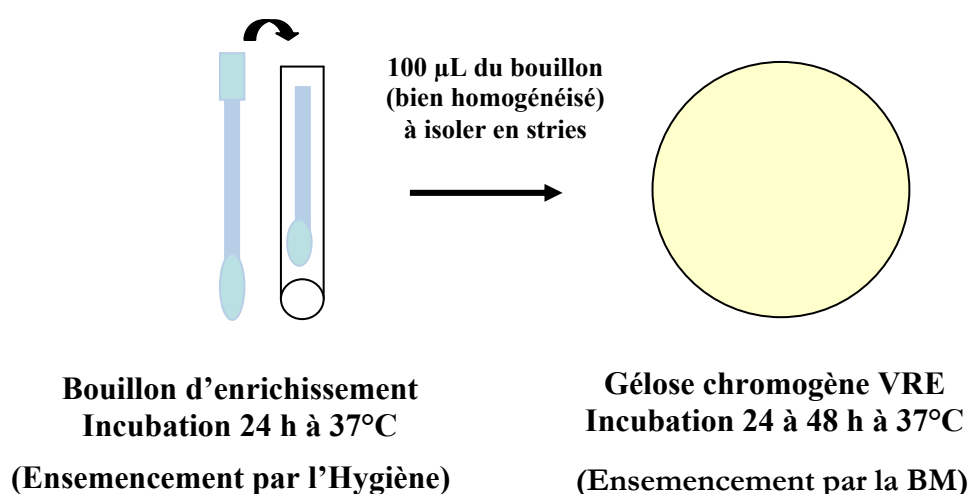
1.3. Phase 3 : ajout d'une étape → passage par un bouillon VRE (AES) : du 28/02/07 au 23/04/07

Devant le manque de sensibilité et de spécificité évident du milieu VRE (AES), une nouvelle réflexion a été posée : fallait-il ou non passer par une étape d'enrichissement en bouillon sélectif ? Deux écoles existent actuellement en France, dans les établissements de soins subissant ou ayant subi des épidémies d'ERG. Le Kremlin Bicêtre de même que le CHU de Clermont Ferrand recommandent l'utilisation d'un bouillon, l'hôpital de la Pitié Salpêtrière non. Après une brève revue de la littérature (cf. paragraphe 3.1.), il apparaît certes, que l'utilisation d'un bouillon sélectif augmente la sensibilité,

mais allonge aussi le délai de rendu des résultats avec un surcoût important. **Dans le cadre d'une épidémie d'ERG, il faut trouver un équilibre entre sensibilité et délai de rendu des résultats.** En effet, un manque de sensibilité peut entraîner l'absence de détection de patients porteurs, avec un risque de transmission au personnel soignant ou aux autres patients (par absence de mesures spécifiques d'hygiène ou d'isolement), et une dissémination dans le service. L'allongement du délai de rendu des résultats peut entraîner un maintien non justifié de l'isolement, ou un retard de transfert en secteur de cohorting, pouvant se traduire par une perte de chances pour le patient, et une dissémination de l'ERG dans le service. De ces deux maux, lequel choisir ?

Nous avons décidé **la mise en place d'une étape d'enrichissement en bouillon** (VRE, AES Laboratoires). L'objectif était l'augmentation de la sensibilité en l'absence, dans l'état actuel de l'équipement du laboratoire, de moyens permettant de recourir à une extraction automatisée avec détection par PCR temps réel. L'augmentation attendue était $\geq 10\%$.

Pendant cette période, tous les écouvillons ont été ensemencés directement en bouillon VRE (contenant 3 $\mu\text{g/mL}$ de vancomycine), sans isolement en parallèle sur gélose VRE (nous n'avons donc pas pu faire une évaluation comparée de la sensibilité avec ou sans bouillon). Tous les bouillons, qu'ils soient troubles ou limpides, étaient ensuite ensemencés sur gélose VRE ; l'expérience du Kremlin Bicêtre ayant en effet montré que certains entérocoques poussent, sans créer un trouble dans le milieu. Le protocole technique ainsi que l'arbre décisionnel d'interprétation de résultats sont présentés Figure 45.



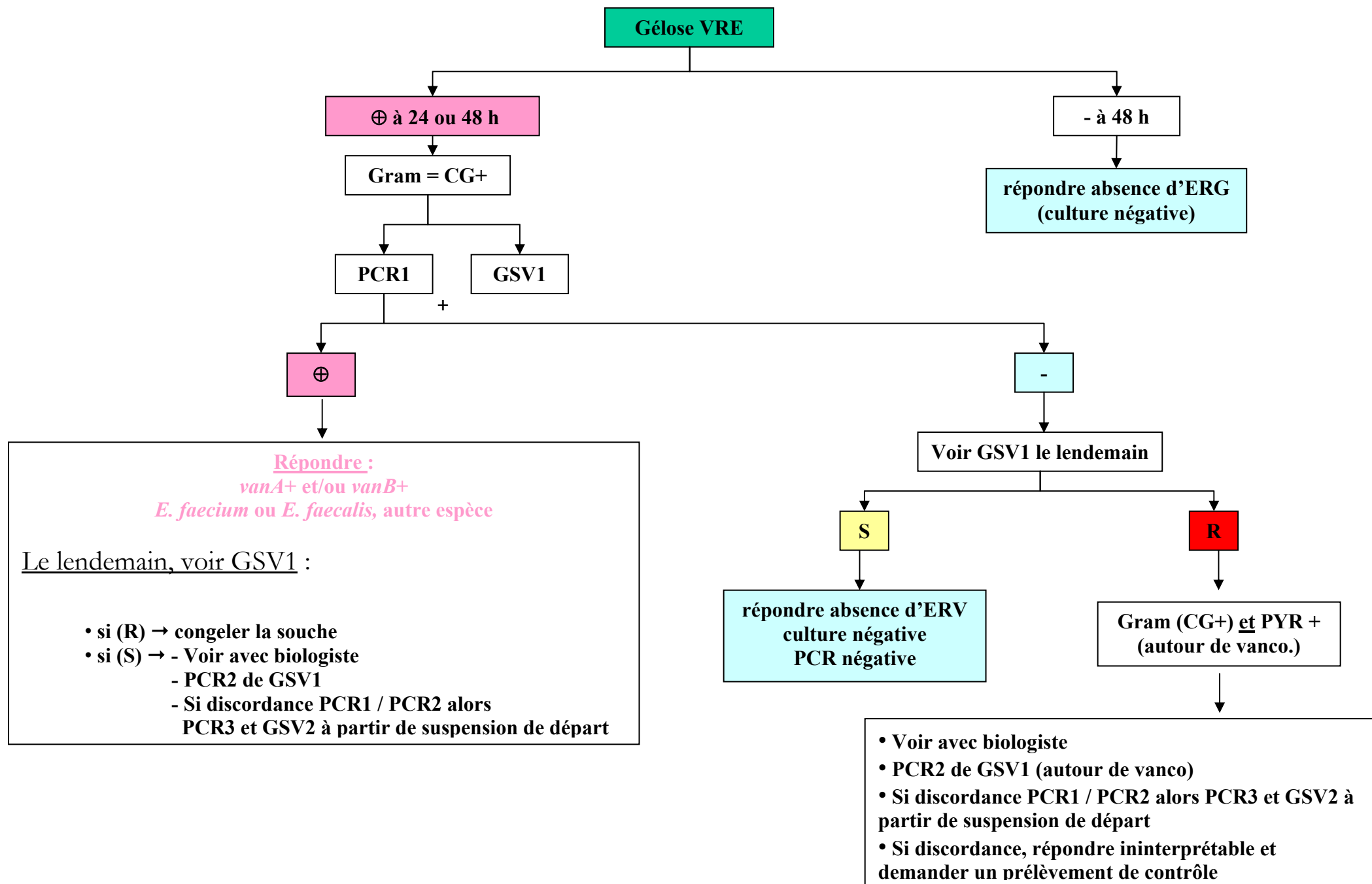


Figure 45 : Protocole technique, et interprétation des résultats durant la **PHASE 3**.

L'addition d'une étape d'enrichissement en bouillon nous a permis d'augmenter le taux de détection d'environ 1% (Figure 46), et la sensibilité de quelques pour cent, sans atteindre les 10% escomptés.

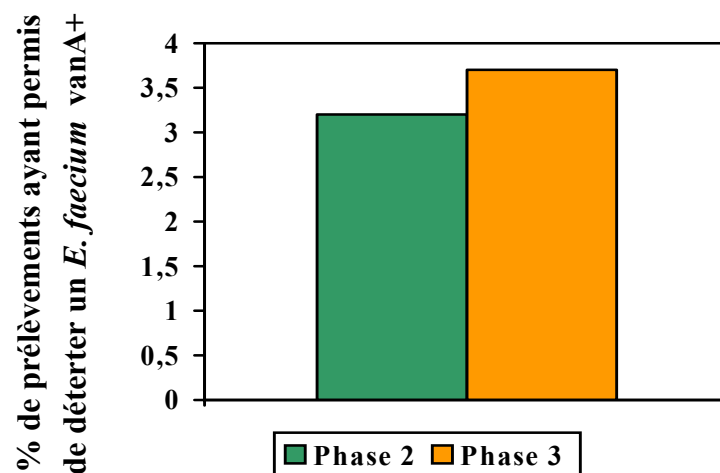


Figure 46 : Taux de détection, sans (Phase 2) ou avec enrichissement (Phase 3).

Ce gain a été obtenu sans modification du délai d'alerte téléphonique en cas de suspicion d'un patient ERG+, mais a décalé de 24 h le rendu définitif des résultats (Figure 47).

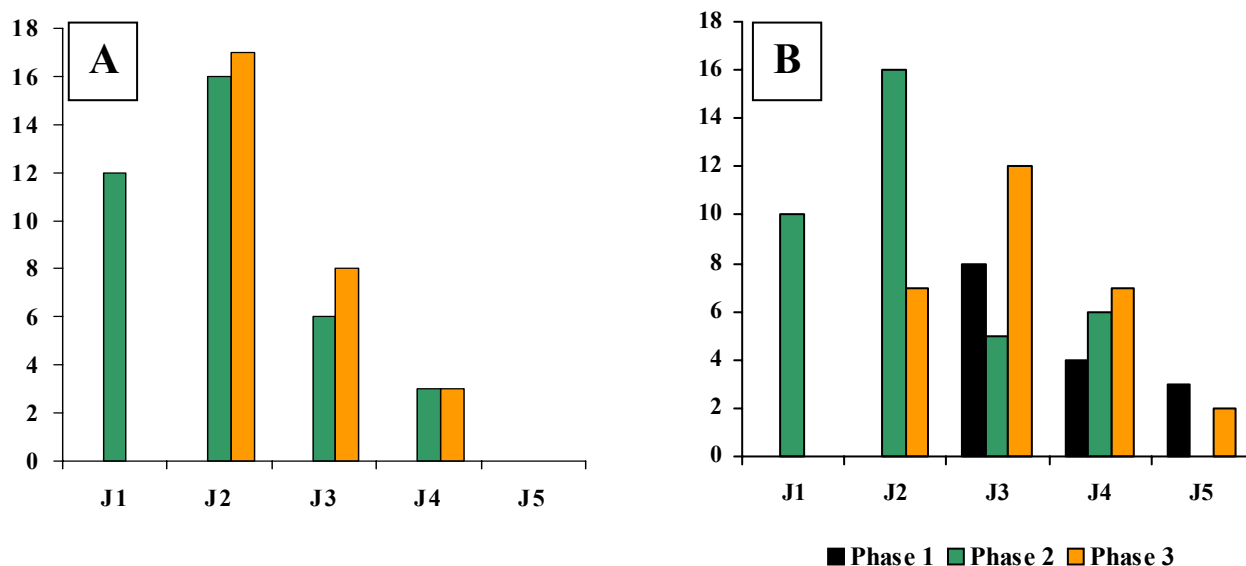


Figure 47 : Délai de rendu des résultats lors des trois premières phases du dépistage des ERG sur écouvillons rectaux. (A) : réponse provisoire par alerte téléphonique ; (B) : réponse définitive.

Le principal inconvénient de cette méthode reste la diminution importante de spécificité engendrée par l'étape supplémentaire. Ainsi, plus de 60% des prélèvements ont donné des colonies suspectes bleu-vert, et par conséquent ont été envoyés en PCR.

Cette augmentation du nombre de faux positifs, impliquant un nombre de PCR réalisées très important (de 200 à 350 PCR par semaine, soit environ 60 PCR / jour), couplé à l'augmentation du délai de rendu définitif des résultats, nous a poussé à ré-évaluer le bien fondé de l'étape « bouillon d'enrichissement ». Nous étions alors en plein pic épidémique, et même s'il était certes indispensable de ne pas passer à côté d'un patient porteur, il était surtout nécessaire de rendre les résultats dans les meilleurs délais. De plus, nous travaillions avec une équipe réduite de techniciens, en particulier au laboratoire commun de Biologie Moléculaire. Fin avril 2007, nous étions à presque 6 mois d'épidémie, avec un nombre d'écouvillons rectaux gérés par le laboratoire de Bactériologie, sans cesse croissant. Le facteur humain n'étant en aucun cas à omettre dans la gestion d'une telle épidémie, nous devions faire face à ce moment là, à un surcroît phénoménal de travail, avec une équipe réduite, usée et sans cesse sous pression (il est important de comprendre l'implication du rendu d'un résultat faussement négatif ou faussement positif). Après avis et discussion avec la Mission d'appui début avril, il a donc été décidé de stopper l'ensemencement en bouillon d'enrichissement, et de favoriser ainsi la rapidité d'analyse et la spécificité de la méthode. Nous sommes revenus à la phase 2.

A NOTER

La réaction de PYR a été rapidement abandonnée. En effet, certaines souches d'ERG ont donné des réactions PYR- (environ 5-10 % des souches de *E. faecium* sont effectivement PYR-). Par ailleurs, des réactions faussement négatives seraient dues à certains composants contenus dans les milieux chromogènes. Cela est actuellement en discussion avec les fabricants.

1.4. Phase 4 (2bis) : Milieu chromogène VRE (AES Chemunex) : du 23/04/07 au 10/06/07

Nous avons donc repris le schéma d'ensemencement de la phase 2 (Figures 41-43).

Cependant, comme discuté précédemment, le milieu VRE (AES Chemunex) n'était pas satisfaisant en terme de sensibilité, de spécificité, et ne nous semblait pas assez sélectif (croissance de nombreux microorganismes autres que les entérocoques : BGN, BGP). Par ailleurs, la concentration en vancomycine (6 µg/mL) ne semble pas suffisante à l'inhibition de croissance des entérocoques naturellement résistants (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*). Nous avons donc débuté une évaluation de ce milieu, en comparaison de deux autres milieux chromogènes sélectifs : chromID VRE (bioMérieux) et chromAgar VRE (Chromagar Laboratoires). Ces travaux sont présentés paragraphe III, et ont abouti au changement de milieu le 10 juin 2007, avec utilisation, depuis cette date, du milieu chromID VRE (bioMérieux).

1.5. Evolution du nombre de PCR réalisées et de leur difficulté d'interprétation lors des différentes phases du dépistage

1.5.1. Evolution du nombre de PCR réalisées

Lors de la période d'étude, du 5 février au 23 juillet 2007, le nombre hebdomadaire d'écouvillons testés a été relativement stable : de 500 à 800 par semaine en moyenne, à l'exception des semaines où ont eu lieu les enquêtes de prévalence, le nombre se situant alors entre 1500 et 2800 écouvillons dans la semaine (Figure 48).

Le nombre de PCR réalisées est plus variable : de 20 à 360 par semaine, selon le milieu utilisé, l'ajout d'une étape d'enrichissement, et la phase épidémique dans laquelle nous nous situons (rappel : les pics épidémiques ont eu lieu de février à avril, et en juin 2007, cf. Figure 31 page 122). Différents éléments intéressants sont cependant à noter.

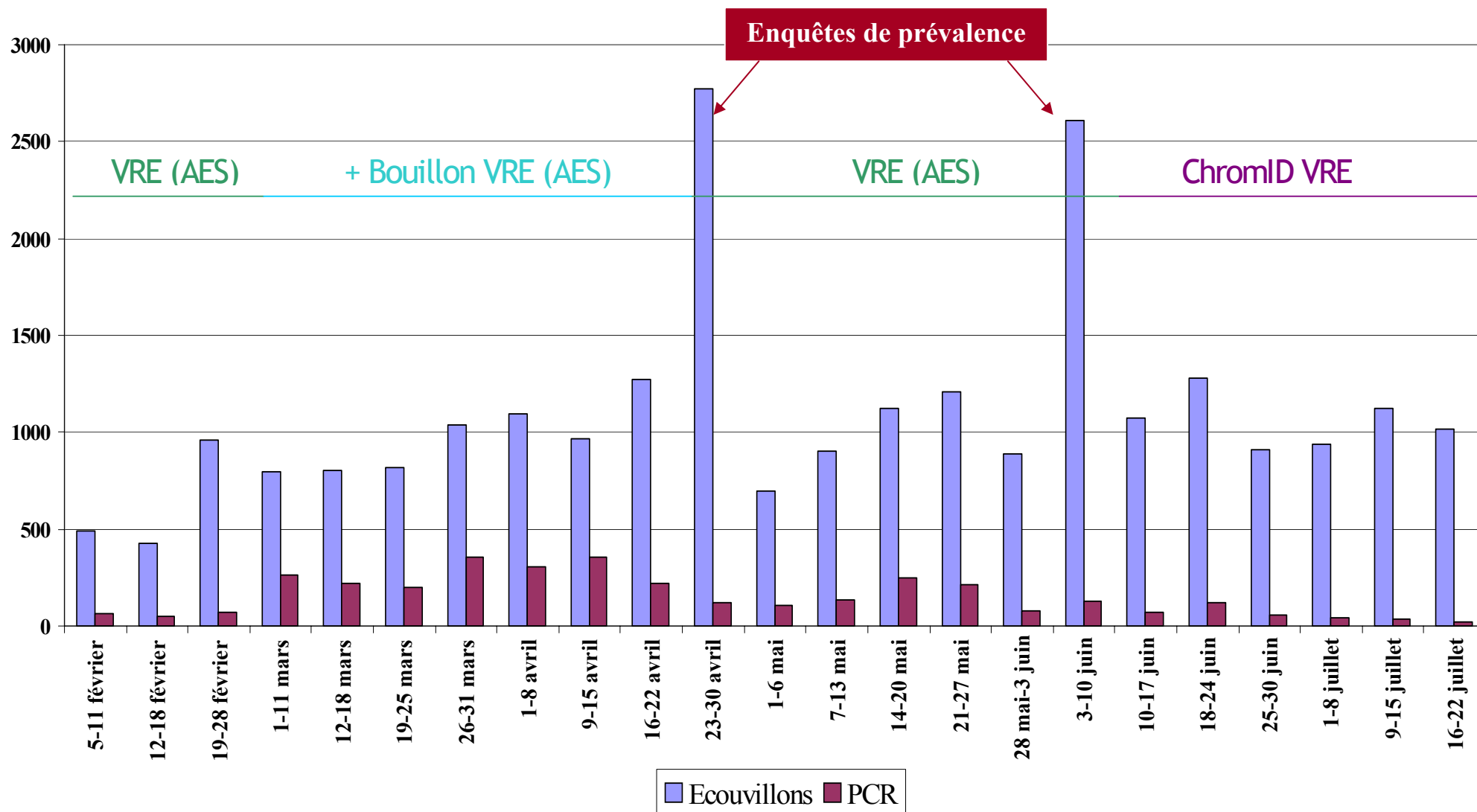


Figure 48 : Evolution du nombre d'écouvillons rectaux testés, comparaison avec le nombre de PCR réalisées pour confirmation.

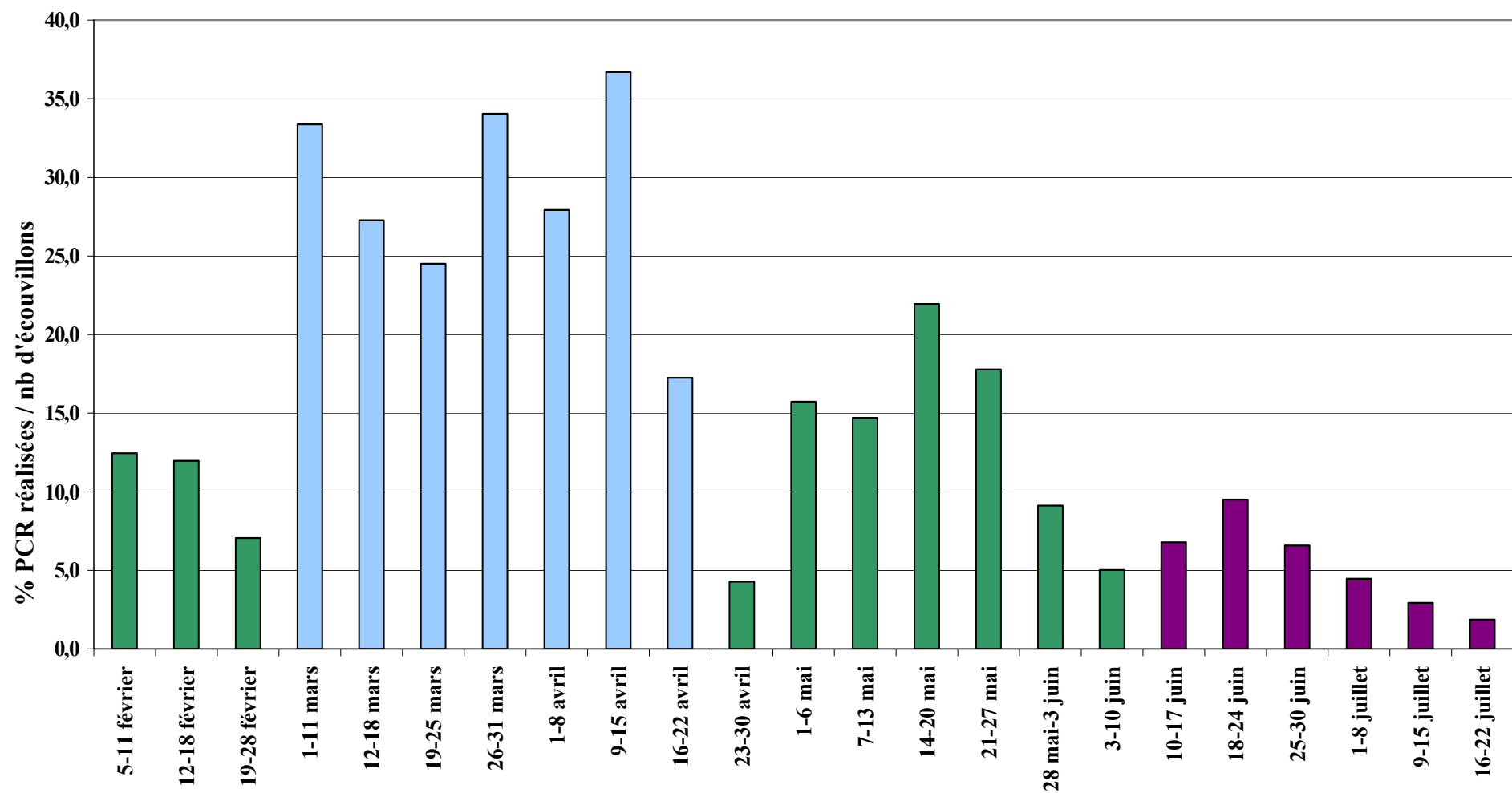


Figure 49 : % du nombre de PCR réalisées, en fonction du nombre d'écouvillons rectaux testés.

La Figure 49 met ainsi en évidence :

- (i) une augmentation significative du nombre de PCR réalisées, durant la phase d'ajout d'un bouillon d'enrichissement. Ainsi, par rapport au nombre d'écouvillons ensemencés, le nombre de PCR est passé de 10-15% à > 30 % durant cette période. Cela s'explique par une augmentation des faux positifs, donnant des colonies bleu-vert, facilement confondues avec les colonies typiques d'ERG.
- (ii) une diminution significative du nombre de PCR réalisées depuis le changement de milieu chromogène, et le passage au milieu chromID de bioMérieux (5 % en moyenne, contre 15 % avec le milieu VRE de AES). Ainsi, ce milieu plus spécifique et sensible, permettant une identification présomptive des *E. faecium* et *E. faecalis*, permet d'éliminer un grand nombre de faux positifs, et de diminuer ainsi le nombre de PCR réalisées.

Ces résultats sont certes à nuancer au regard de l'évolution de la prévalence des ERG au sein de CHUN et des autres établissements de soins lorrains, mais nous parlons là en nombre global de PCR réalisées, et non en terme de PCR positives. Cette courbe d'évolution du nombre de PCR réalisées est intéressante puisqu'elle met en lumière les difficultés rencontrées, pour le personnel du laboratoire (techniciens et biologistes) en terme de charge de travail, de temps à consacrer à cette « activité ERG », tout en ne délaissant pas le travail de « routine » du laboratoire. Cela explicite aussi les raisons de l'arrêt du bouillon d'enrichissement et du changement de milieu chromogène sélectif.

1.5.2. Difficultés d'interprétation de PCR : quelques exemples

Exemple n°1 (P1) Des colonies violettes + autres sont isolées sur milieu chromID VRE. Une suspension en eau physiologique stérile est réalisée, envoyée au laboratoire commun de Biologie Moléculaire. Les résultats de la PCR sont présentés Figure 50.

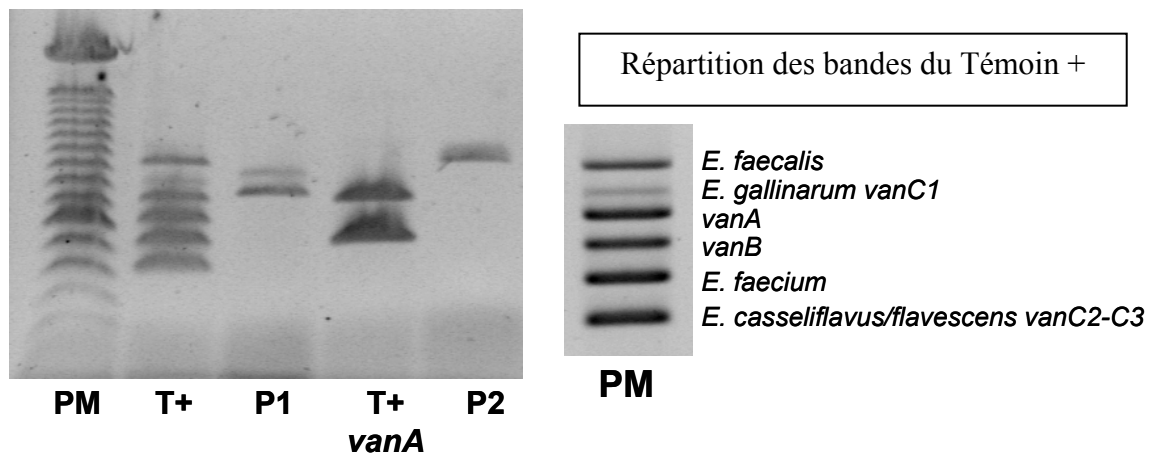


Figure 50 : Résultats de la PCR. P1 : notre échantillon. P2 : *E. faecalis*.

A la lecture de ce gel, deux bandes apparaissent : une pouvant correspondre à *E. gallinarum vanC1*, l'autre à *vanA*, cependant avec un petit décalage vers les hauts poids moléculaires. Le lendemain, les colonies ne sont pas contact au disque de vancomycine, et la souche est sensible. Une identification est réalisée... Il s'agissait d'un *S. epidermidis*, et donc de bandes aspécifiques !

Exemple n°2 (P3)

Des colonies violettes toujours... en nombre assez important dans ce cas, permettant la réalisation d'une coloration de Gram : elle fait apparaître à la fois des CGP et des BGN. Les résultats de la 1^{ère} PCR sont présentés Figure 51.

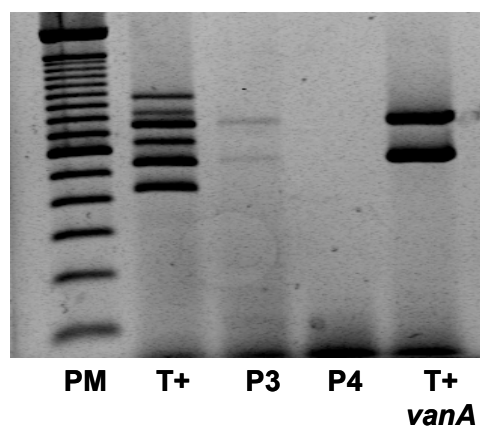


Figure 51 : Résultats de la PCR. P3 : notre échantillon. P4 : PCR négative.

La PCR fait apparaître deux bandes très faibles mais correspondant à *E. faecium* et à *vanA* ! Une suspicion de portage d'ERG est signalée au service, mais demande confirmation... Ou infirmation !! La PCR n°2 réalisée à partir de la gélose chromID VRE de départ est... négative ! De plus les colonies au contact du disque de vancomycine le lendemain sont en fait des bacilles à Gram -.

Cet exemple illustre bien la nécessité de prudence et la difficulté liée à l'interprétation de la PCR surtout lorsqu'il s'agit d'une suspicion de portage. A noter que nous avons observé régulièrement ce profil de bandes pour des bacilles à Gram -.

Exemple n°3 (P5)

Des colonies violettes, encore et toujours... un mélange CGP et BGN... Les résultats de la PCR sont présentés Figure 52 et mettent en évidence de nombreuses bandes aspécifiques. La 2^{ème} PCR réalisée à partir de la gélose de départ est négative, les colonies non contact au disque de vancomycine.

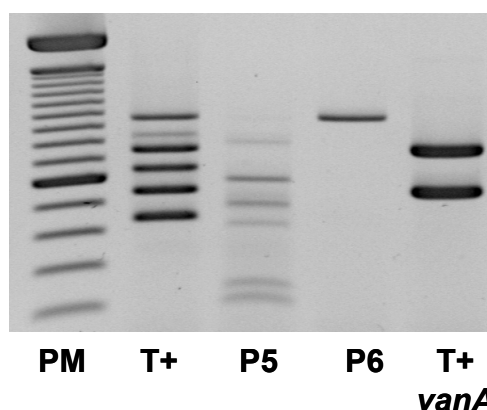


Figure 52 : Résultats de la PCR. P5 : notre échantillon. P6 : *E. faecalis*.

EN RESUME

Ces différents exemples avaient juste pour objectif de mettre en évidence les variations de profil électrophorétique qui peuvent être obtenus à partir de colonies violettes paraissant à l'origine typique d'ERG. L'interprétation et la communication des résultats aux différents interlocuteurs nécessitent la plus grande prudence

Chapitre II. Généralités sur les milieux chromogènes

Les milieux chromogènes contiennent un ou plusieurs substrats enzymatiques, qui vont révéler une activité spécifique d'un ou plusieurs microorganismes. Ces substrats chromogéniques sont des analogues structuraux de molécules naturellement clivées par des enzymes bactériennes ou fongiques. Initialement, le substrat est incolore, après clivage, les aglycones libérés acquièrent des propriétés chromogéniques (Figure 53) [Perry & Freydière, 2007].

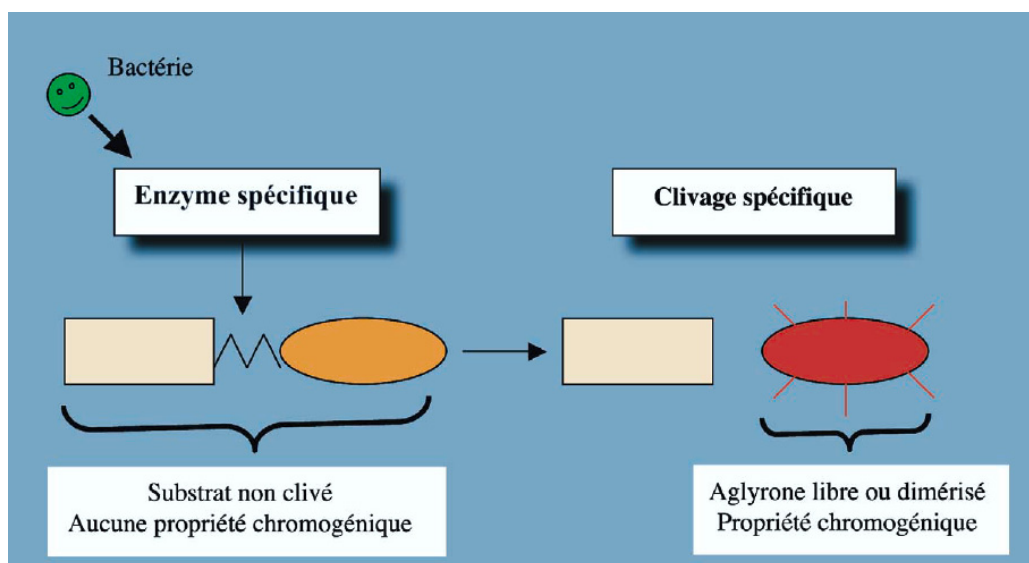


Figure 53 : Principe de fonctionnement des substrats.

2.1. Principe

Deux éléments importants doivent être pris en compte pour le choix des substrats :

- l'activité enzymatique que l'on souhaite révéler,
- les propriétés physico-chimiques du substrat.

Il faut choisir de préférence des substrats qui précipitent, donnant des colonies de couleur caractéristique de la réaction, mais ne diffusant pas dans la gélose.

Il est primordial de réaliser un compromis entre la croissance des bactéries et la qualité de la réaction enzymatique. En effet, les milieux chromogènes sont appauvris en éléments nutritifs compétiteurs,

afin que la bactérie à identifier hydrolyse spécifiquement le substrat chromogénique, le risque principal restant une croissance faible du microorganisme.

Un milieu chromogène idéal ne devrait mettre en évidence qu'une seule activité enzymatique très spécifique, ne nécessitant pas la réalisation de tests complémentaires.

2.2. Intérêts des milieux chromogènes par rapport aux milieux classiques

① Visualisation et différenciation aisées des colonies colorées : simplicité et rapidité

La détection d'activités enzymatiques spécifiques par des substrats chromogéniques se traduit par l'apparition de colonies colorées. Ces milieux permettent donc une bonne visualisation des différentes espèces dans les cultures pluri-microbiennes (écouvillons rectaux, par exemple, dans le cadre du dépistage des ERG). Une identification directe de certains microorganismes est ainsi parfois possible sur le primo-isolément. La lecture est ainsi facilitée.

② Economie de réactifs et de temps technicien

L'identification directe de la ou des espèce(s) en cause réduit le nombre de tests complémentaires nécessaires : tests biochimiques ou enzymatiques, galeries, subcultures... Et représente aussi un gain de temps technicien non négligeable.

③ Rapidité et efficacité de la mise en place d'une antibiothérapie ou d'un isolement

L'identification étant facilitée et accélérée, l'instauration d'une antibiothérapie probabiliste ciblée peut être réalisée très rapidement. Dans le cadre de la mise en évidence d'une Bactérie Multi-Résistante (BMR) (ERV, par exemple), l'isolement du patient peut être réalisé dans les meilleurs délais.

④ Taux de détection, sensibilité, spécificité, sélectivité

La sélectivité est généralement recherchée pour augmenter les chances de détection du pathogène dans une flore pluri-microbienne, ou pour éliminer des microorganismes donnant des colonies de couleur et d'aspect semblable au pathogène recherché. Cette sélectivité est généralement obtenue avec des antibiotiques et/ou des antifongiques, ou diverses substances toxiques pour certains microorganismes (azide de sodium par exemple).

Les exigences de sensibilité et de spécificité sont variables selon le type de milieu, le type de prélèvement, et le cadre dans lequel celui-ci est réalisé (diagnostic, dépistage...).

⑤ Coût des milieux plus important mais coût global de la méthode allégé

L'estimation du coût d'une méthode ne doit pas inclure seulement le coût du réactif, mais aussi prendre en compte l'économie d'autres tests (identification, subculture), le gain en temps technique, et la rapidité de rendu des résultats.

Bien que les milieux chromogéniques soient plus onéreux que les milieux classiques, leur utilisation se traduit généralement par une économie puisqu'ils permettent une meilleure détection des microorganismes avec une diminution des tests complémentaires.

EN RESUME

L'incorporation de substrats chromogéniques dans les milieux gélosés permet une meilleure visualisation des différentes espèces dans les cultures mixtes et peut même aboutir à une identification directe de certains microorganismes si l'enzyme détectée est suffisamment spécifique. L'utilisation de milieux sélectifs, par addition d'antibiotiques ou de diverses substances chimiques, peut permettre en particulier une détection rapide et efficace des BMR.

Chapitre III. Evaluation de 3 milieux chromogènes sélectifs : VRE (AES Chemunex), ChromID VRE (bioMérieux) et CHROMAgar VRE (CHROMAgar Laboratoires)

Pour un laboratoire, le choix d'un milieu chromogène est fonction des performances du milieu, de la nature des prélèvements ainsi que de la fréquence d'isolement du pathogène. Dans le cadre du dépistage des ERG, au cœur d'un phénomène épidémique, le milieu de détection utilisé se devait d'être sensible (détection de tous les porteurs), spécifique (en particulier ne générant pas de faux positifs, cela pouvant résulter en une fausse alerte, et surtout en la mise en isolement d'un patient non porteur dans un secteur dédié ERG+), et devait permettre le rendu des résultats en un temps minimum (24-72 h). Fiabilité, facilité de lecture, rapidité mais aussi absence d'interférence avec la technique de PCR multiplex mise en place, ont été les principaux critères de notre évaluation. Le dépistage des ERG se fait essentiellement à partir d'écouvillonnages rectaux, dans le cadre du dépistage hebdomadaire dans les services hébergeant des patients porteurs, mais aussi dans le cadre du dépistage entrée/sortie dans les Services les plus à risque, ou connus comme ayant hébergé des patients porteurs.

Après une brève revue de la littérature et une présentation succincte des différents milieux chromogènes étudiés, nous présenterons les résultats de notre évaluation, à la fois sur des isolats cliniques parfaitement identifiés, mais aussi dans le cadre réel d'utilisation de ces milieux, à partir d'écouvillons rectaux.

3.1. Revue de la littérature

3.1.1. Les différentes techniques de culture à notre disposition

Alors que des méthodes sensibles sont requises pour le dépistage des ERG, elles doivent aussi permettre de déterminer rapidement le phénotype Van. Quelques publications ont décrit l'utilité des milieux de culture ; mais peu nombreuses sont celles qui ont impliqués ces techniques dans des

protocoles qui permettent une caractérisation des ERG avec exactitude, efficacité et rapidité. L'objet de ce paragraphe est de présenter les différentes études menées sur les milieux et les bouillons d'enrichissement, afin de replacer notre étude dans son contexte.

▣ Quels milieux ?

Peu de milieux spécifiques pour la détection des ERG existaient jusqu'à très récemment. L'émergence et la dissémination de ces pathogènes en milieu hospitalier a conduit les fabricants à la recherche de nouveaux milieux plus spécifiques, plus sensibles, tout en améliorant la facilité de lecture. Les milieux se distinguent par les agents sélectifs contenus (antibiotiques, antifongiques), la présence ou non de substrat chromogène, le délai de lecture, la nécessité de tests complémentaires.

Les 1^{ères} études datent du milieu des années 1990, lorsque les épidémies en France étaient encore rares. Les premiers milieux ont été mis au point simplement à partir de géloses déjà utilisés pour l'isolement sélectif d'*Enterococcus faecium*, auxquelles a été ajoutée de la vancomycine [Delmas et al., 2005]. Les études ont ensuite porté sur la composition du milieu (base Mueller Hinton ou BHI), et sur la concentration en vancomycine, 6 µg/mL semblant le meilleur compromis sensibilité/spécificité, quel que soit l'inoculum [Swenson et al., 1994 ; Van Horn et al., 1996]. De nombreuses publications se sont intéressées au milieu bile-esculine-azide, sous forme de milieu commercial (Enterococcosel®, Becton Dickinson) ou de milieu « maison », et ont montré que certes ce milieu est sensible et spécifique, mais nécessite l'association des méthodes rapides permettant de caractériser les ERG [Sahm et al., 1999]. Divers autres milieux ont aussi été évalués : gélose céphalexine-aztréonam-arabinose, gélose au sang + néomycine, gélose MH polymyxine-streptomycine, tout cela en présence de concentrations variables de vancomycine [Ford et al., 1994 ; Chadwick & Oppenheim, 1995 ; Landman et al., 1996]. Brown et al. ont, par exemple, évalué deux milieux : un contenant du méropénème et de la vancomycine à 6 µg/mL, par comparaison au milieu Enterococcosel®, sur 218 écouvillons rectaux. Ils n'ont pas noté de différence significative entre les deux milieux, avec une détection de tous les ERG à 24 h et la croissance des mêmes contaminants [Brown & Walpole, 2003].

Seules trois études ont été publiées sur les milieux chromogènes, toutes uniquement sur le milieu chromID VRE (bioMérieux) [Delmas et al., 2007 ; Ledebøer et al., 2007a, Ledebøer et al., 2007b]. Ces études ont comparé le milieu chromID VRE à une gélose type bile-esculine-azide contenant 6 mg/L de vancomycine, et ont montré des performances variables de ce milieu, cependant supérieures à celles du milieu bile-esculine : sensibilité 86,6-96,8%, spécificité 73,9-100%, valeur prédictive positive (VPP) 75% (pour *E. faecalis*) à 92,7% (pour *E. faecium*). Elles ont toutes conclu à l'avantage de ce milieu par comparaison au milieu classique : identification présomptive *E. faecium* / *E. faecalis*, pas de croissance des entérocoques naturellement résistants aux glycopeptides, pas besoin de tests complémentaires (hormis une coloration de Gram) et lecture possible dès 24 h d'incubation. Nous discuterons des résultats de ces différentes études par rapport à notre étude dans le paragraphe 3.5.3.

▣ Quels prélèvements ?

Les deux types de prélèvement les plus adéquats dans le cadre d'un dépistage de portage intestinal sont les selles et les écouvillons rectaux, chacun ayant leurs avantages et inconvénients (Tableau VI) [Drews et al., 2006].

L'étude de Ieven et al. a retrouvé une prévalence de 16,9% de portage lorsque l'étude est réalisée sur selles, contre 5,7% sur écouvillons rectaux. Ils ont attribué cette différence à un probable biais de recueil sur ER [Ieven et al., 1999].

Il est donc indispensable de bien vérifier que l'ER reçu est « sale », c'est à dire enduit de selles. Ne pas oublier non plus, que de tels prélèvements peuvent avoir un impact psychologique fort sur le patient (refus)... voire sur le personnel soignant, des cas de refus de réalisation ayant déjà été observés.

Tableau VI : Avantages et inconvénients des deux types de prélèvements envisageables pour le dépistage du portage intestinal d'ERG.

	Selles	Ecouvillon rectal
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Densité des ERG plus importante = moins de faux négatifs • Possible recueil chez patients sous chimiothérapie, radiothérapie ou transplantés de moelle osseuse • Possible conservation par congélation • Rares cas d'inhibition de la PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Facile à réaliser • Très utile quand grand nombre d'échantillons à tester • Moins de faux positifs
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Recueil plus contraignant • Traitement fastidieux quand les prélèvements sont répétés et en grand nombre • Nombreux faux positifs (spécificité faible) 	<ul style="list-style-type: none"> • Risque plus élevé de faux négatifs (quantité ERG moindre) • Contre-indiqué chez patients sous chimiothérapie, radiothérapie ou transplantés de moelle osseuse • Inhibition plus fréquente de la PCR, nécessite une double extraction

▣ Pour quels patients ?

D'Agata et al. se sont intéressés à la corrélation entre la concentration en ERG dans les selles et différents paramètres. L'étude a porté sur 13 patients, avec 3 recueils de selles par patient. La concentration en ERG retrouvée était de 2,5 à 8,1 CFU/g selles. La Figure 54 présente la corrélation entre le nombre de CFU/g de selles, et le taux de détection par écouvillonnage rectal. Ainsi, il faut compter au moins 10^6 CFU/g de selles pour détecter au moins 80 % des porteurs !

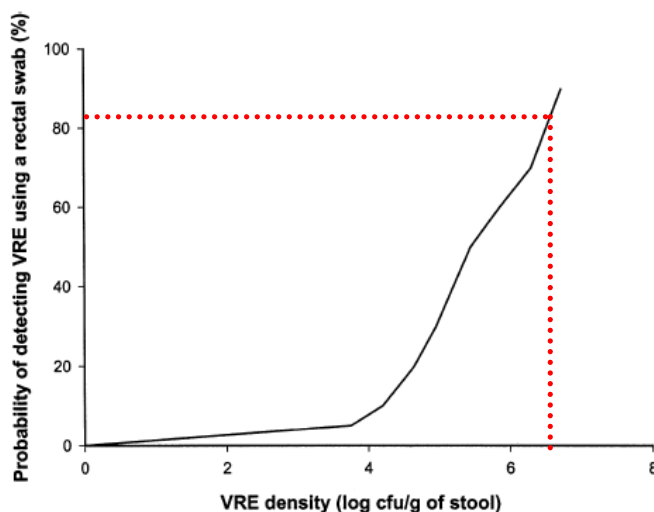


Figure 54 : Relation entre la probabilité de détecter un ERG par écouvillonnage rectal, et la quantité d'ERG retrouvée dans les selles (en CFU/g selles) (d'après [D'Agata et al., 2002]).

Par ailleurs, il ne semble pas exister de corrélation entre cette concentration et la colonisation cutanée. Aucune relation n'a pu être par ailleurs notée concernant : la diarrhée, l'immobilisation, l'âge > 50 ans ou l'existence de plaies infectées par un ERG [D'Agata et al., 2002]. Il existe par contre une corrélation entre la prise d'antibiotiques et la concentration d'ERG dans les selles : une augmentation de la densité de portage a ainsi été notée chez les patients ayant reçu un antibiotique la semaine précédant le prélèvement.

3.1.2. Intérêt ou non d'un bouillon d'enrichissement

De nombreux auteurs se sont penchés sur le problème, et la plupart ont noté une augmentation significative de la sensibilité après enrichissement [Ford et al., 1996]. L'étude de Ieven et al. a évalué la gélose Enterococcosel® sur échantillons de selles et écouvillons rectaux, avec ou sans étape d'enrichissement. Ils ont montré une amélioration nette (x 2) du taux de détection des ERG *vanA* : 53,4% des souches ont été isolées sur gélose seule, contre 99,9% après enrichissement [Ieven et al., 1999]. Les faux négatifs sur gélose seraient dus à l'existence de patients faiblement excréteurs. Ils ont conclu que le taux de détection peut être fortement sous-estimé sans enrichissement et que les enquêtes de prévalence sont inappropriées dans ce cas [Ieven et al., 1999].

D'autres auteurs ont noté le manque d'intérêt de cette étape d'enrichissement, la jugeant inapplicable en phase épidémique. Brown et al. ont ainsi montré une absence d'amélioration avec comme principal inconvénient de nombreux faux positifs (en particulier la croissance d'entérocoques naturellement résistants aux glycopeptides). L'enrichissement sur 24-48 h allonge trop le délai de rendu des résultats, l'incubation sur une période plus courte (6 h), n'a aucun effet [Brown & Walpole, 2003].

L'enrichissement demande une quantité de travail supplémentaire, non forcément réalisable facilement en routine, et peut entraîner jusqu'à 14 % de faux positifs [Ieven et al., 1999].

3.1.3. Exemple de schéma proposé dans la littérature

Différents protocoles sont proposés dans la littérature, utilisant des techniques variées avec des enchaînements plus ou moins complexes. Le schéma ci après (Figure 55) est celui proposé par Sahm et al., et faisant appel suite à une étape de culture sur milieu sélectif, à des méthodes soit phénotypiques, soit génotypiques ; les deux protocoles donnant de bons résultats [Sahm et al., 1999].

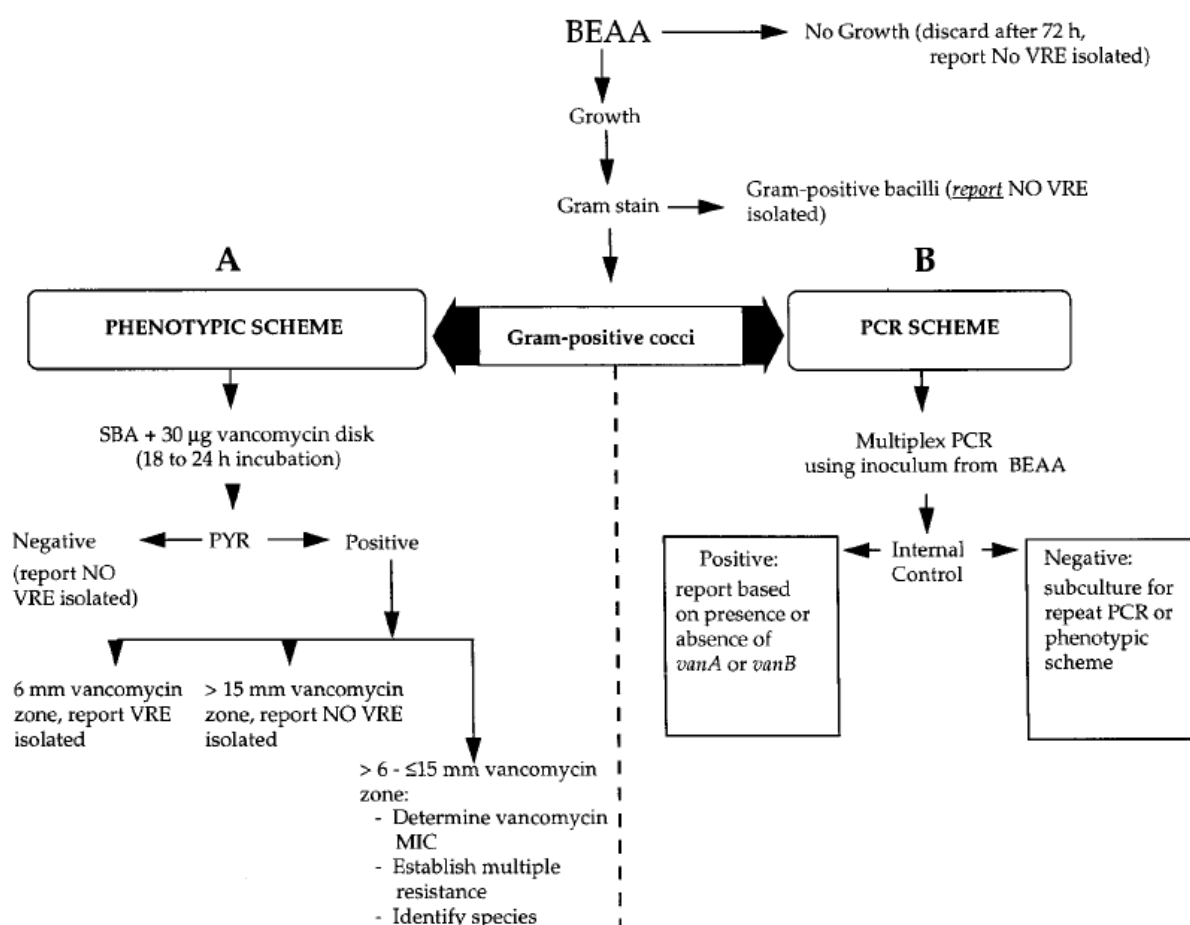


Figure 55 : Schéma proposé par Sahm et al., à partir d'un ensemencement sur milieu bile-esculine-azide, avec une caractérisation soit phénotypique, soit génotypique [Sahm et al., 1997].

EN RESUME

Si la technique utilisée est peu sensible, que le taux de détection sur écouvillons rectaux est donc faible, soit les précautions contact ne sont pas instaurées, soit elles sont stoppées de façon erronée, puisque le patient est faussement étiqueté « ERG- ». Même si la dynamique de transmission des ERG est complexe, le principal mécanisme de transmission de patient à patient est parfaitement identifié : ce sont les mains du personnel soignant après contact avec un patient porteur. Une colonisation cutanée est donc un pré-requis à la transmission croisée. La technique de dépistage employée se doit donc d'être sensible, spécifique, rapide et simple à mettre en œuvre. Le choix doit se faire sur le type de milieu (sélectif ou sélectif + chromogène), sur la concentration en vancomycine (6 ou 8 µg/mL, selon le clone local), et sur le nombre de tests complémentaires nécessaires. L'amélioration de la sensibilité est possible par ajout d'une étape par bouillon sélectif d'enrichissement, mais cela augmente aussi la quantité de travail, le coût et le nombre de faux positifs... Tous ces paramètres sont à prendre en compte pour le choix d'une méthode optimale.

3.2. Présentation des milieux étudiés

Les principales caractéristiques des différents milieux étudiés sont présentées Tableau VII.

✱ BBL Enterococcosel (Becton Dickinson)

La gélose Enterococcosel™ est un milieu à base d'esculine et d'azide de sodium, généralement utilisé pour la détection rapide et sélective, ainsi que pour la numération des entérocoques. Les entérocoques sont en effet capables de cliver l'esculine, alors que les streptocoques (sauf Streptocoques du groupe D) n'en sont pas capables.

Le principe du milieu Enterococcosel™ est donc simple : il repose sur l'hydrolyse de l'esculine en escutéline, qui va réagir avec le citrate d'ammonium ferrique pour former un complexe noir (d'où la coloration noire des colonies sur ce milieu). La bile contenue dans le milieu suffit à inhiber la pousse des cocci à Gram + autres que les entérocoques, tandis que l'azide de sodium empêche la croissance des bactéries à Gram -. Les colonies d'entérocoques ou de streptocoques du groupe D apparaissent petites, translucides, brunâtres à noires.

Les **limites** de ce milieu, soulignées par le fabricant, sont les suivantes :

- différentes espèces peuvent pousser sur la gélose : *Listeria monocytogenes*, Streptocoques du groupe D, *Pediococcus* spp., et *Staphylococcus* spp. Les colonies ont cependant un aspect et une couleur aisément distinguables des colonies noires des entérocoques.
- d'autres microorganismes n'apparaissent que sous forme de traces de pousse, ou de toutes petites colonies (*Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Candida* spp., bacilles à Gram -).

Ce milieu était utilisé au sein du laboratoire de Bactériologie du CHUN avant la découverte de l'épidémie d'ERG, en vue de la recherche et de la détection des porteurs d'ERG au niveau intestinal,

chez les patients à risque. Au vu des différents problèmes de spécificité et de sensibilité rencontrés avec ce milieu, une réflexion sur les milieux chromogènes a été lancée, et est l'objet du travail qui suit.

✱ VRE (AES Chemunex)

La gélose VRE est une gélose chromogénique spécifique des entérocoques et supplémentée en vancomycine. La présence d'agents sélectifs (dont la nature ne nous est pas connue...) permettrait d'inhiber la croissance de la flore interférente à Gram + et à Gram -, tandis que la culture des entérocoques est favorisée. Les entérocoques exprimant une β -glucosidase clivent spécifiquement un substrat chromogène colorant les colonies en bleu-vert. De part la concentration en vancomycine (6 mg/L), certains entérocoques possédant un bas niveau de résistance naturelle (CMI vancomycine 2-32 μ g/mL) peuvent croître sur ce milieu.

La recherche d'ERG peut être réalisée à partir de selles, par écouvillonnage rectal. Ils recommandent **d'exprimer l'écouvillon dans 2 mL de sérum physiologique**. Si une étape d'enrichissement est effectuée, l'équivalent de 10 gouttes doit être déposé dans le bouillon, incubé à 37°C pendant 18-24 h.

La gélose VRE doit être **ensemencée par écouvillonnage**.

Après une incubation de 24-48 h, il est recommandé de :

- confirmer l'appartenance au genre *Enterococcus*,
- vérifier la résistance à la vancomycine (mesure de la CMI par Etest).

D'après le fabricant, les **limites** de ce milieu chromogène sont les suivantes :

- certaines bactéries de type *Bacillus* spp. peuvent pousser, en présentant une coloration bleue, la morphologie de la colonie étant différente des ERV.
- D'autres espèces bactériennes à Gram + sont naturellement résistantes à la vancomycine (*Pediococcus* spp., *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc* spp.) et peuvent par conséquent

être isolées sur ce milieu. Cependant les colonies ne présenteront pas une coloration bleu-vert (de quelle couleur sont-elles alors ?... rien n'est effectivement indiqué).

Il est précisé qu'il convient donc à l'utilisateur de confirmer l'identification de l'espèce.

✱ CHROMAgar™ VRE (CHROMAgar Laboratoires)

Ce milieu n'était pas encore commercialisé au moment de l'étude (commercialisation septembre 2007), aucune donnée ne nous a été communiquée par le fabricant. Les seules informations dont nous disposons sont la couleur des colonies :

- *E. faecium* et *E. faecalis* ERG : rouge
- *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* : bleu ou inhibé
- Autres micro-organismes : variable

✱ ChromID™ VRE (bioMérieux)

La gélose ChromID™ VRE contient deux substrats chromogènes et un mélange d'antibiotiques (dont vancomycine 8 mg/L) permettant :

- la croissance spécifique et sélective des ERG ;
- l'identification présomptive de *E. faecium* et *E. faecalis* par la coloration caractéristique des colonies :

E. faecium : coloration violette des souches par production de β -galactosidase

E. faecalis : coloration bleu-vert des souches par production d' α -glucosidase

Le mélange sélectif permettrait d'inhiber :

- les souches d'entérocoques ne présentant pas de résistance acquise à la vancomycine ;

- les espèces d'entérocoques présentant une résistance naturelle à la vancomycine (phénotype VanC : *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*)
- la plupart des bactéries à Gram -, à Gram +, levures et moisissures.


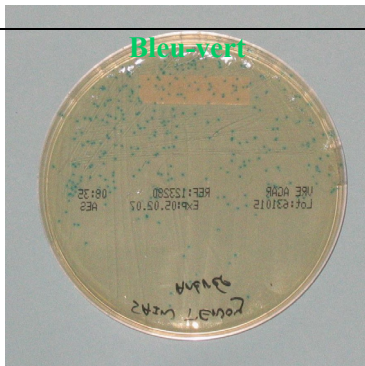
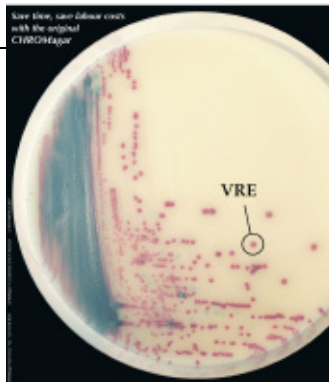
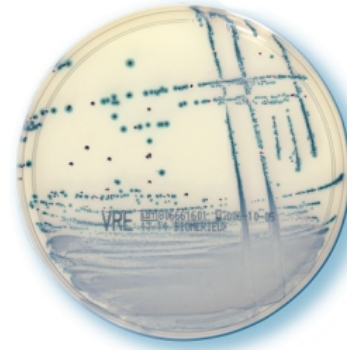
Les géloses doivent être conservées entre 2 et 8 °C, **à l'abri de la lumière**.

Les échantillons peuvent être de différente nature : selles, écouvillons rectaux et urines. Ils peuvent être ensemencés directement sur la gélose ou après enrichissement en bouillon.

Les **limites** du test suggérées par le fabricant sont les suivantes :

- Certaines souches d'entérocoques autres que *E. faecium* et *E. faecalis* et présentant une résistance acquise à la vancomycine de phénotype rare (ex : *E. gallinarum vanA*) peuvent se développer sur le milieu en donnant des colonies violettes ou vertes.
- Certains microorganismes autres que les entérocoques (dont levures et bacilles à Gram -) peuvent se développer sur le milieu en formant des colonies caractéristiques avec un aspect morphologique généralement différent.
- Le développement est fonction des exigences propres à chaque microorganisme. Certaines souches de *E. faecium* ou *E. faecalis* présentant une résistance à la vancomycine (ERV) mais ayant des exigences spécifiques (substrat, température, atmosphère d'incubation) peuvent ne pas se développer ou ne pas donner des colonies caractéristiques.
- Dans le cas d'un ensemencement direct et après 48 h d'incubation, si l'inoculum est particulièrement chargé, il est possible d'observer au point d'inoculation des colonies caractéristiques de *E. faecium* ou *E. faecalis* sensibles à la vancomycine.
- Du fait d'un niveau de résistance à la vancomycine moins élevé, les entérocoques de phénotype VanB peuvent ne présenter des colonies caractéristiques qu'à 48 h d'incubation.

Tableau VII : Principales caractéristiques des différents milieux chromogènes commerciaux utilisés pour la détection des ERG.

	<u>BBL Enterococcosel Agar</u> (BD)	<u>VRE</u> (AES Chemunex)	<u>CHROMagar VRE</u> (CHROMagar Microbiology)	<u>ChromID VRE</u> (BioMérieux)
Composition	Peptone caséine 20 g Oxgall (bile deshydratée) 10 g NaCl 5 g Esculine 1 g Citrate ammonium ferrique 0,5 g Azide de Na 0,25 g Agar 13,5 g Vancomycine 8 mg/L	Base nutritive 30 g/L Agar 14 g/L Base sélective 11 g/L Substrat chromogène 0,3 g/L Vancomycine 6 mg/L	Composition non communiquée par le fabricant (milieu actuellement non commercialisé) Vancomycine 6 mg/L	Peptone caséine/viande 18 g Peptone cœur 3 g Amidon de maïs 1 g NaCl 6 g Agar 15 g Mélange chromogène 0,13 g Mélange sélectif 28,8 mg Dont vancomycine 8 mg/L
Principe	Hydrolyse de l'esculine en esculétine + dextrose Réaction de l'esculétine avec le citrate ammonium ferrique : ir	Identification des colonies produisant une β -glucosidase	?	Identification des colonies produisant une β -galactosidase ou une α -glucosidase
Aspect des colonies <i>E. faecium vanA</i>				
Aspect des colonies des autres bactéries	Staphylocoques/Microcoques : grosses colonies blanches, opaques Corynebacterium spp. : blanc à jaune Candida spp. : blanches BGN : pas de pousse	Bacillus spp., E. avium : bleu E. gallinarum, E. casseliflavus/flavescens : vert Levures : blanches BGN : vertes	E. gallinarum, E. casseliflavus/flavescens : bleu Levures : blanches BGN : bleu-vert 176	E. faecalis : bleu-vert Levures : blanches BGN : grosses colonies violettes

3.3. Données préliminaires sur souches de collection

3.3.1. Présentation des souches

Ces souches sont des isolats cliniques que nous avons congelés après un premier isolement chez un patient du CHUN. Ces isolats sont parfaitement identifiés et caractérisés : identification et antibiogramme par Vitek2 (BioMérieux), identification des gènes de résistance *van* par PCR Multiplex, identification du clone par PFGE.

- *E. faecium vanA*
- *E. faecalis vanA*
- *E. gallinarum*
- *E. casseliflavus*
- *E. avium vanB*
- *Lactobacillus* + *Pediococcus*
- Mélange de divers microorganismes : *E. faecium vanA*, levures, Entérobactéries, *Lactobacillus*, *Pediococcus*.

3.3.2. Ensemencement des milieux

- décongélation des souches
- mise en culture sur gélose au sang
- réalisation d'une suspension bactérienne dans 500 µL d'eau physiologique stérile
- homogénéisation par agitation au vortex
- incubation 24-48 h à 35°C puis lecture : aspect des colonies et dénombrement

3.3.3. Résultats et discussion

L'objectif de cette 1^{ère} approche était d'évaluer la spécificité des trois milieux chromogènes, à savoir leur capacité à autoriser uniquement la pousse des *Enterococcus* spp. résistants à haut niveau à la vancomycine (ce qui doit exclure les souches naturellement résistantes telles que *E. gallinarum* et *E. casseliflavus/flavescens*). Dans l'idéal, ces milieux ne devraient pas permettre la croissance des bacilles à Gram - (pourtant naturellement résistants à la vancomycine), des bacilles à Gram + ou des autres cocci à Gram + (*Lactococcus*, *Pediococcus*, eux-aussi naturellement résistants à la vancomycine). Cette étude préliminaire nous a permis de faire les constatations suivantes (Tableau VIII) :

* Milieu VRE (AES Chemunex)

Ce milieu est très peu spécifique et de lecture peu aisée. En effet, toutes les souches ont montré une bonne croissance sur ce milieu, après 24 ou 48 h, et ce, avec une couleur des colonies identique (vert ou bleu-vert), à l'exception des levures qui ont donné des colonies blanches. La plupart de ces souches ont donné des colonies en 24 h et avec une densité importante.

* Milieu ChromID VRE (bioMérieux)

Comme attendu, la souche *E. faecium vanA* a poussé en donnant des colonies violettes, et *E. faecalis vanA*, des colonies bleu-vert. La croissance de *E. faecalis* semble plus facile (nombre de colonies beaucoup plus important dès 24 h d'incubation). Les souches d'*Enterococcus* spp. possédant un faible niveau de résistance à la vancomycine (*E. avium vanB*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) n'ont pas donné de colonies sur ce milieu. La croissance des BGN et des levures est possible mais avec un aspect des colonies sensiblement différents des espèces cibles recherchées (violet avec un halo blanc pour les BGN, grosses colonies par comparaison aux colonies obtenues avec *E. faecium vanA* ; vert clair pour les levures contre bleu-vert pour *E. faecalis*). Cette différenciation nécessite cependant une

certaine pratique et habitude de manipulation du milieu, mais peut être facilement réalisée par coloration de Gram.

Un petit bémol est cependant à noter : la croissance est faible à 24 h par comparaison aux autres milieux ; et une incubation à 48 h semble nécessaire (ce qui allonge le délai de rendu des résultats).

Ce milieu semble donc spécifique, sensible et permet une identification présomptive de *E. faecium* et *E. faecalis*.

Tableau VIII : Aspect des colonies et dénombrement après 24 et 48 h d'incubation, des souches de collection, sur les 3 milieux testés.

	VRE (AES)		ChromID VRE (bioMérieux)		CHROMAgar (Chromagar Laboratoires)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>E. faecium vanA</i>	++ Vert	+++	+	++ Violet	++ Rose	++
<i>E. faecalis vanA</i>	+++ Vert	+++	++ Bleu-Vert	+++	++ Rose à violet (variable selon la densité)	++
<i>E. avium vanB</i>	- Bleu-Vert	++	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i>	+++ Vert	+++	-	-	+	++ Bleu
<i>E. casseliflavus</i>	+ Bleu-Vert	++	-	-	-	-
<i>Lactobacillus + Pediococcus</i>	- Vert	+++	-	-	-	-
Mélange	- Vert : <i>E. faecium</i> Vert foncé : BGN Blanc : levures	++	+	++ Ptes violettes : <i>E. faecium</i> Grosse violettes un peu blanches : BGN	+	+

* Milieu CHROMAgar (Chromagar Laboratoires)

Une bonne croissance est obtenue pour *E. faecium vanA* et *E. faecalis vanA* sur ce milieu, dès 24 h d'incubation, avec cependant une couleur identique des colonies (rose). *E. gallinarum* a donné quelques colonies, mais avec une couleur facilement distinguable de celle des espèces cibles (bleue). Les autres entérocoques naturellement résistants à la vancomycine, ou porteur du gène *vanB*, n'ont pas présenté de croissance. Les BGN donnent des colonies bleu-vert.

Ce milieu paraît aussi spécifique que le milieu ChromID VRE (bioMérieux), mais ne permet pas de distinguer *E. faecium*/*E. faecalis*. De plus, avec un inoculum important, les souches naturellement résistantes peuvent pousser.

EN RESUME

Cette étude préliminaire sur souches de collection nous a permis de nous familiariser avec les 3 milieux, de mieux appréhender la couleur des colonies suspectes, ainsi que celle des colonies de bactéries de la flore contaminante. Elle nous a donné une première idée sur les avantages et les inconvénients de chacun des milieux.

3.4. Evaluation des performances des 3 milieux sur des écouvillons rectaux réalisés dans le cadre du dépistage ERG

3.4.1. Ensemencement des milieux

Soixante quatorze écouvillons rectaux ont été utilisés dans cette étude (consécutifs, choisis au hasard parmi les 1300 écouvillons réalisés lors de l'enquête de prévalence de portage digestif, réalisé en mai 2007 au CHUN). Ils ont été prélevés dans le cadre du dépistage systématique entrée/hebdomadaire/sortie chez les patients des services à risque ou connu comme hébergeant ou ayant hébergé des patients porteurs, à l'Hôpital Central, au mois de mai 2007.

Le traitement des échantillons a été le suivant :

- mise en suspension et homogénéisation des écouvillons dans 500 μ L d'eau physiologique stérile
- homogénéisation par agitation au vortex
- dépôt de 100 μ L de cette suspension sur chacun des milieux à tester
- ensemencement par séparation à l'öse de 10 μ L
- incubation 24-48 h à 35°C
- lecture : aspect des colonies, dénombrement puis suivi de la procédure habituelle du laboratoire (cf. paragraphe 1.2.)

3.4.2. Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons considéré comme :

- **VRAI POSITIF** : la présence de colonies suspectes (définies comme telles par les fabricants) sur au moins un des 3 milieux, suivie d'une confirmation de l'identification et de la résistance par PCR multiplex.
- **FAUX POSITIF** : la présence de colonies suspectes sur au moins un des 3 milieux, infirmé par PCR multiplex.
- **VRAI NEGATIF** : en cas d'absence de colonies ou de présence de colonies non typiques.
- **FAUX NEGATIF** : l'absence de colonies suspectes sur au moins un milieu, mais isolement d'ERG sur un autre milieu, confirmé par PCR multiplex.

Les performances de chaque milieu sont présentées Tableaux IX et X.

1) Temps de pousse / Nombre et aspect des colonies

Après 24 h d'incubation, les colonies suspectes présentent une croissance plus importante sur le milieu VRE (AES), mais cela est valable aussi pour les colonies autres que *E. faecium* ou *E. faecalis vanA*. A 48 h, cependant, les colonies sont plus nombreuses et plus typiques, quelque soit le milieu chromogène considéré.

2) Sensibilité, Spécificité, Valeur Prédictive Positive, Valeur Prédictive Négative

Trois prélèvements seulement se sont révélés positifs à *E. faecium vanA* (VRAIS POSITIFS), ce qui correspond à la prévalence globale de notre épidémie, donc au nombre de patients porteurs à dépister, en routine (4 % dans cette étude, contre 1 % dans la suite de l'étude sur le milieu ChromID VRE). Concernant ces 3 souches ERG :

- Elles ont toutes été détectées par le milieu VRE et le milieu chromID VRE, avec cependant un nombre de colonies significativement plus important à 48 h, permettant une détection plus aisée.
- Une souche n'a pas été détectée sur le milieu chromAgar à 24 h, et a donné seulement quelques colonies à 48 h. C'est le seul FAUX NEGATIF obtenu lors de cette étude. A noter que ce prélèvement n'a donné que de rares colonies sur les autres milieux ; l'inoculum était donc probablement très faible. Cela démontre la capacité de ces milieux à dépister même les faibles excréteurs, et l'intérêt de réaliser une lecture à 48 h.

☐ Performances brutes, sans réalisation d'une coloration de Gram (Tableau IX)

Tableau IX : Performances des différents milieux chromogènes testés

SANS COLORATION de GRAM.

Temps d'incubation (h)	Milieu	VP	FP	VN	FN	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
24	VRE	3	10	61	0	100	86	23	100
	chromID VRE	3	2	69	0	100	98	60	100
	chromAgar VRE	2	0	71	1	67	100	100	98
48	VRE	3	22	49	0	100	70	12	100
	chromID VRE	3	7	64	0	100	90	30	100
	chromagar VRE	3	4	67	0	100	95	43	100

■ **Très bonne sensibilité** (100 %) **et valeur prédictive négative** (100 %) **comparables pour les 3 milieux**. Un petit bémol cependant pour le milieu ChromAgar VRE (comme précisé ci-dessus) : un faux-négatif à 24 h, ce qui implique une sensibilité de 67 % et une VPN de 98 %. Cependant, au vu du faible nombre d'ERG dépistés lors de cette étude préliminaire, les résultats présentés ci-dessus ne doivent pas remettre en cause la sensibilité de ce milieu, et des données complémentaires doivent être obtenus. La VPN excellente (100%) signifie que lorsqu'un échantillon est rendu négatif, on est certain à 100% que le prélèvement est négatif (résultat à prendre cependant avec précautions, cela ne signifie pas en effet que l'on est assuré à 100% que le patient n'est pas porteur d'ERG, l'écouvillonnage étant une technique aléatoire).

■ **Spécificité beaucoup plus variable selon le milieu considéré** : très bonne pour ChromID VRE et Chromagar VRE (98 et 100 %, respectivement, à 24 h), plus faible pour le milieu VRE (86 % à 24 h) du fait de la croissance de nombreux contaminants sur ce milieu, dès 24 h d'incubation, en particulier

dans le 1^{er} quadrant d'ensemencement (effet inoculum). Cela peut peut-être s'expliquer par une composition différente en agents sélectifs.

Cette bonne spécificité s'explique du fait que les contaminants présentent une faible croissance, voire aucune (preuve de l'efficacité des agents antibactériens et antifongiques présents dans le milieu pour supprimer la flore intestinale normale) ; de plus, lorsqu'une croissance est observée, la couleur des colonies est facilement distinguable des colonies d'ERG. Un faible taux de faux positifs est obtenu.

A 48 h, on note une diminution de la spécificité pour tous les milieux : 70 %, 90 % et 95 % respectivement pour VRE, chromID VRE et chromAgar VRE (Tableau IX). Cela s'explique par une prolifération plus importante de la flore contaminante.

Les faux positifs (très importants pour le milieu VRE) incluent essentiellement des BGN, des levures et des CGP, autres que des entérocoques (Figure 60). De façon intéressante, nous avons constaté, pour le milieu chromAgar VRE, une absence totale de contaminants à 24 h. Pour les 3 milieux, nous avons observé une augmentation de la proportion de CGP autres que des entérocoques, plus difficiles à identifier en tant que contaminants (cf. infra).

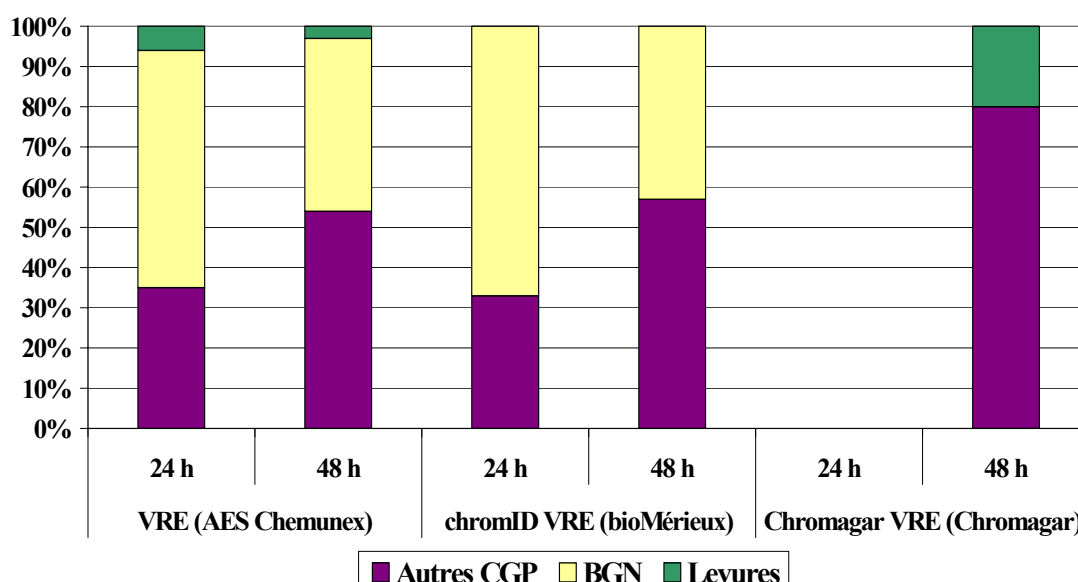


Figure 56 : Répartition des faux positifs à 24 h et à 48 h pour chacun des milieux.

Sur le milieu VRE, nous avons constaté une croissance importante des *Enterococcus* spp. possédant une résistance intrinsèque à la vancomycine (*E. gallinarum* *vanC1*, *E. casseliflavus/flavescens* *vanC2/C3*), avec des colonies semblables à celles obtenues pour les ERG. Les milieux chromID VRE et chromAgar VRE semblent être, de ce point de vue, plus sélectifs.

■ **Valeur prédictive positive** : très variable (meilleure valeur obtenue pour chromAgar VRE), mauvaise pour les 3 milieux à 48 h.

Cela signifie que lorsque des colonies suspectes poussent sur le milieu, seuls 12, 30 et 43% (respectivement pour VRE, chromID VRE et chromAgar VRE) de ces colonies seront réellement des *E. faecium* *vanA*. L'ensemencement sur ces milieux doit donc s'accompagner de tests complémentaires tels que : coloration de Gram, identification, confirmation de la résistance (technique Vitek2 ou PCR multiplex).

☐ Performances après réalisation d'une coloration de Gram (Tableau X)

La simple réalisation d'une coloration de Gram sur un frottis réalisé à partir d'une colonie suspecte, permet de réduire de façon importante le nombre de faux positifs : élimination des BGN, des levures, des BGP... reste les cocci à Gram positif autres que les entérocoques, ou même les entérocoques naturellement résistants aux glycopeptides, qui ne peuvent être éliminés par simple coloration de Gram. Cela représente 30 à 50 % des faux positifs pour les milieux VRE et chromID VRE, contre près de 80 % pour le milieu chromAgar (!). Ceux-ci nécessiteront d'autres tests complémentaires, comme discutés ci-dessus.

Tableau X : Performances des différents milieux chromogènes testés.

AVEC COLORATION de GRAM.

Temps d'incubation (h)	Milieu	VP	FP	VN	FN	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
24	VRE	3	3	68	0	100	96	50	100
	ChromID VRE	3	0	71	0	100	100	100	100
	Chromagar VRE	2	0	71	1	67	100	100	98
48	VRE	3	10	61	0	100	86	23	100
	ChromID VRE	3	3	68	0	100	96	50	100
	Chromagar VRE	3	3	68	0	100	96	50	100

Cela se traduit par une nette amélioration de la spécificité et de la valeur prédictive positive (Tableau X). Cette observation confirme les conclusions d'autres auteurs [Delmas et al., 2007 ; Ledebøer et al., 2007a ; Ledebøer et al., 2007b].

EN RESUME

La principale limite de cette étude préliminaire est le faible nombre d'écouvillons testés (n=74), et le faible nombre d'ERG détectés (n=3). Cependant, cela correspond à la prévalence au sein du CHUN lors de la réalisation de cette évaluation, et donc nous a permis d'étudier ces milieux dans une situation identique au dépistage de « routine ».

Cette étude nous a permis de montrer (i) une sensibilité et une VPN équivalentes pour les 3 milieux ; (ii) une spécificité et une VPP plus faibles pour le milieu VRE, avec une croissance importante des contaminants de la flore intestinale. Nous avons démontré l'importance de la réalisation d'une coloration de Gram sur les colonies suspectes, comme déjà recommandé par d'autres auteurs [Delmas et al., 2007 ; Ledebøer et al., 2007a ; Ledebøer et al., 2007b].

Dans l'urgence du contexte épidémique, il nous fallait choisir un milieu très rapidement. Les performances des milieux chromID VRE et chromAgar VRE, d'autres arguments ont penché dans la balance : (i) une lecture plus aisée pour le milieu chromID VRE (milieu chromAgar VRE opaque), (ii) une possible identification présomptive de *E. faecium* (violet) et *E. faecalis* (bleu-vert). Le milieu chromID VRE étant par ailleurs le seul commercialisé début juin 2007, nous l'avons choisi pour la poursuite de notre étude prospective.

3.5. Evaluation du milieu ChromID VRE (bioMérieux) en situation épidémique

3.5.1. Ensemencement du milieu

Cette étude a été menée sur **2560 écouvillons rectaux**, dans le cadre du dépistage systématique entrée/hebdomadaire/sortie chez les patients des services à risque ou connu comme hébergeant ou ayant hébergé des patients porteurs, à l'Hôpital Central, entre juin et août 2007.

Dès réception au laboratoire, les écouvillons sont **directement déchargés au bord de la gélose chromID VRE** ; l'ensemencement se fait ensuite par séparation à l'öse de 10 µL, en effectuant des stries serrées, en tournant 4 fois la boîte d'un angle de 90°C. Les milieux sont ensuite incubés à 37°C et examinés après 24 et 48 h d'incubation.

➔ **Si absence de culture ou de colonies suspectes** (violette ou bleu-vert) après 48 h d'incubation, le prélèvement est rendu NEGATIF après 48 h. La couleur des colonies de ces échantillons considérés comme négatifs étaient notés de façon systématique sur la feuille de travail, ainsi que le résultat de la coloration de Gram s'il y avait lieu.

➔ **Si présence de colonies suspectes après 24 ou 48 h d'incubation :**

① **Le patient n'est pas connu en tant que porteur d'ERG :**

- si > 10 colonies, on réalise une coloration de Gram
- si cocci à Gram +, une suspension est réalisée en eau physiologique et transférée au laboratoire commun de Biologie Moléculaire, Bactériologie et Hygiène (BMBH) pour réalisation d'une PCR multiplex : identification de l'espèce (*E. faecium*, *E. faecalis*), et recherche des gènes de résistance (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *van C2/C3*).

- si ce sont des bactéries autres que cocci à Gram +, le prélèvement est rendu NEGATIF après 48 h.
- si < 10 colonies, une suspension est réalisée directement et envoyée au Laboratoire BMBH.

② **Le patient est connu porteur d'ERG :**

- ensemencement d'une gélose au sang par séparation, et dépôt d'un disque de vancomycine au début de l'isolement ; incubation 24 h à 37°C.
- si des colonies poussent au contact du disque de vancomycine ou s'il y a des colonies dans la zone d'inhibition autour de la vancomycine, on réalise une coloration de Gram.
- si ce sont des cocci à Gram + et PYR +, on réalise une identification et un antibiogramme sur semi-automate Vitek2.
- si ce sont des bactéries autres que cocci à Gram +, le prélèvement est rendu NEGATIF après 48 h.

3.5.2. Résultats

Sur les 2560 écouvillons rectaux ensemencés, nous avons obtenus :

- **2294** échantillons **NEGATIFS** (90%): absence de croissance, ou colonies de couleur autre que celle des colonies suspectes.
- **266** échantillons ont été **considérés comme POSITIFS** (10%): présence de colonies suspectes. Parmi ces spécimens, la PCR multiplex a permis de confirmer la présence de **25 souches d'ERG** (23 *E. faecium* *vanA*, notre souche épidémique, 1 *E. faecium* *vanB*, 1 *E. faecalis* *vanA*). Cela rend compte d'une prévalence d'environ 1 % lors de notre étude (nous étions dans une phase de régression de l'épidémie).

■ Analyse des colonies violettes

Le milieu chromID VRE nous a permis de détecter **3 souches d'ERG à 24 h contre 23 souches à 48 h**. La croissance de notre clone semblant faible à 24 h, nous avons décidé de continuer la double lecture à 24 et 48 h, afin de ne pas passer à côté d'un éventuel patient porteur (Figure 57).

Cependant, nous avons noté une croissance plus importante des contaminants de la flore intestinale à 48 h, avec une plus grande variété de bactéries identifiées (Figure 57):

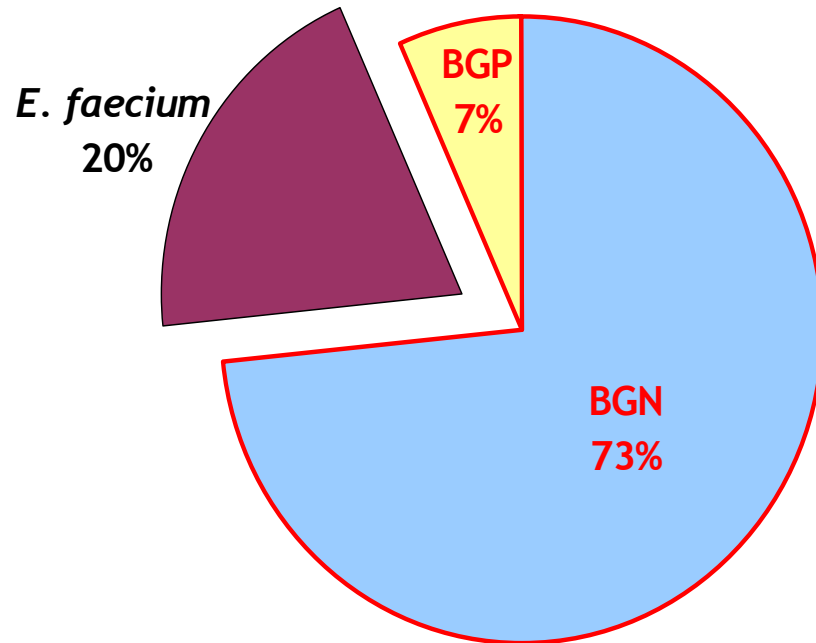
- ainsi, alors qu'**une simple coloration de Gram permet d'éliminer 100 % des contaminants à 24 h** (BGN 73%, BGP 7%), elle ne permet d'éliminer **que 42 % à 48 h** (BGN 16%, BGP 6%, levures 9%).
- Les **58 % de contaminants restant sont des cocci à Gram positif** autres que les ERG, et on a observé, en particulier, la croissance de quelques entérocoques naturellement résistants aux glycopeptides : 2% *E. casseliflavus*, 4% *E. gallinarum*. Ces bactéries ne peuvent être écartées par simple coloration de Gram, et nécessitent la réalisation de tests complémentaires. Cela augmente de façon importante le nombre de PCR multiplex de confirmation réalisées, entraînant une majoration du coût et du temps technique nécessaire.

Ainsi, le dépistage des ERG par ensemencement d'un milieu chromID VRE nécessite une incubation de 48 h afin de permettre la détection de toutes les souches d'ERG (en considérant le cas de notre clone), aux dépens de la spécificité, puisque cela implique un nombre de faux positifs plus important.

100% ← élimination par Gram → 42%

A

3 isolats



B

23 isolats

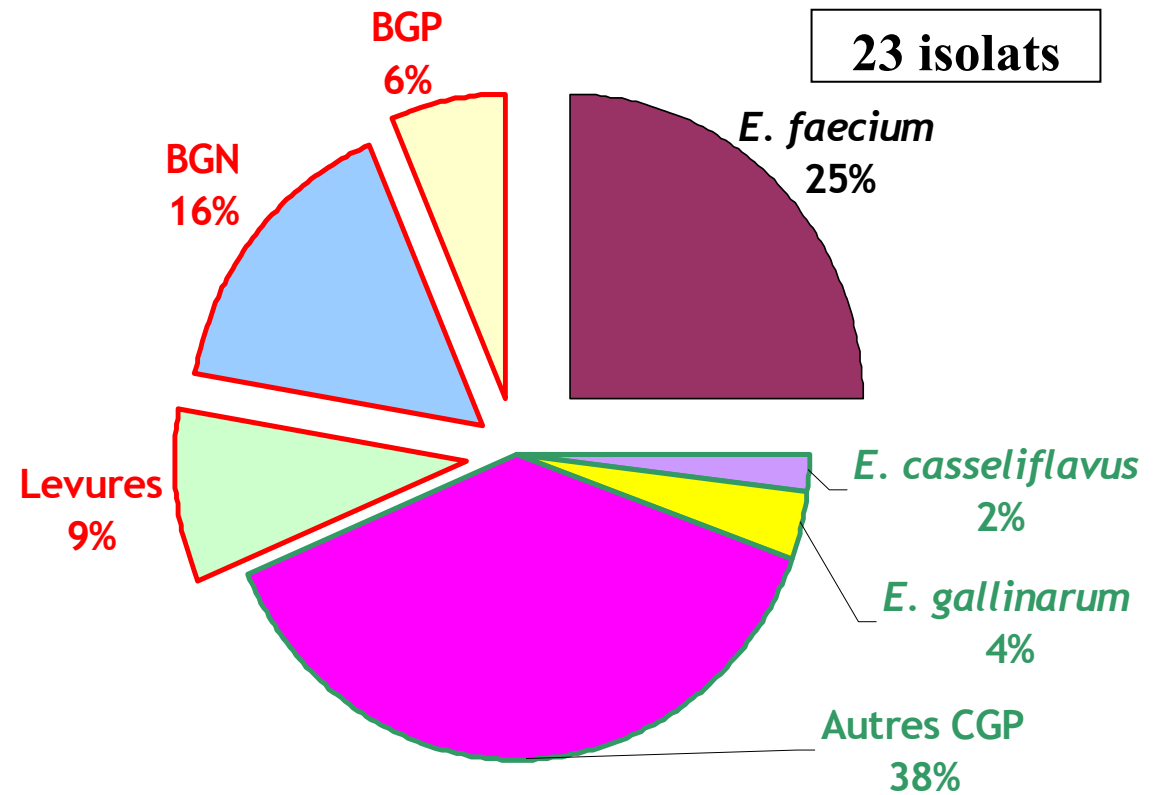


Figure 57 : Identification des bactéries donnant des colonies violettes sur chromID VRE. (A) à 24 h (n = 16); (B) à 48 h (n = 122).

■ Analyse des colonies bleu-vert

Nous avons montré que 60% des colonies bleu-vert isolées sur milieu chromID VRE sont des souches de *E. faecalis*, pour la grande majorité, sensibles aux glycopeptides (Figure 58). Cela pourrait être attribuable à un effet inoculum.

Les principaux autres microorganismes donnant des colonies bleu-vert sont : les BGN, les BGP, quelques rares souches d'*E. gallinarum*, et essentiellement des levures (Figure 58). Cependant, avec l'habitude d'examen des géluses, il apparaît que les levures donnent plutôt des colonies vert pâle, avec parfois un halo blanc, parfaitement distinguables des colonies bleu-vert de *E. faecalis*.

Reste le problème de l'effet inoculum. Cependant, **ce milieu nous a permis d'isoler une souche de *E. faecalis vanA***. Il est donc important, même en présence d'un clone épidémique de *E. faecium vanA*, de surveiller l'émergence d'autres souches résistantes. Nous avons donc pris le parti, devant toute colonie suspecte bleu-vert, de tester la sensibilité à la vancomycine et à la teicoplanine par la méthode de diffusion en milieu gélosé et de faire de plus amples investigations pour les souches pour lesquelles on obtient un diamètre < 17 mm ou des colonies à l'intérieur du diamètre d'inhibition.

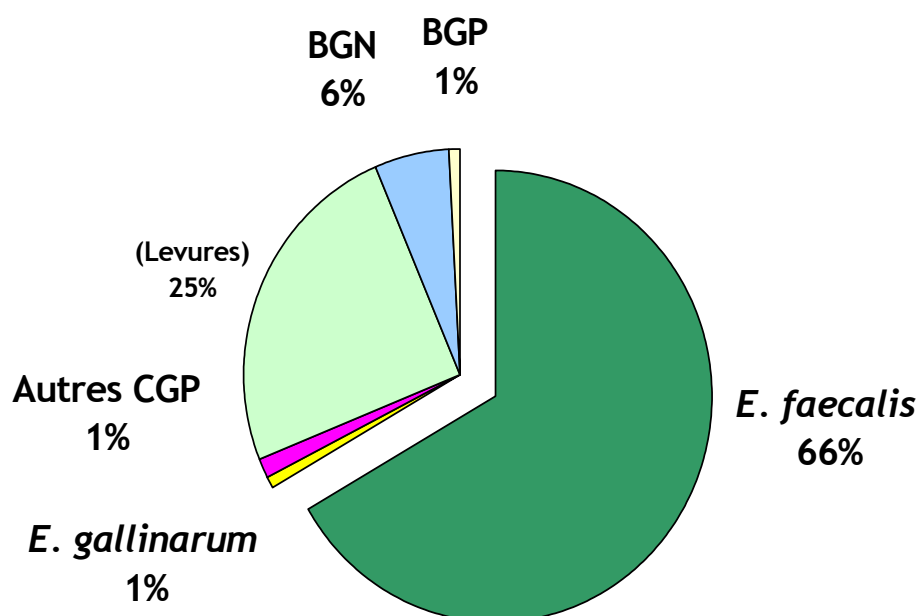


Figure 58 : Identification des bactéries donnant des colonies bleu-vert sur chromID VRE, à 48 h.

■ Analyse des colonies des échantillons « Négatifs »

Sur les 2294 échantillons négatifs, 95 % n'ont pas présenté de croissance sur le milieu chromID VRE (ce qui tend à prouver la bonne sélectivité du milieu). Concernant les 5 % restant, les couleurs des colonies étaient facilement distinguables des colonies suspectes d'ERG (Figure 59).

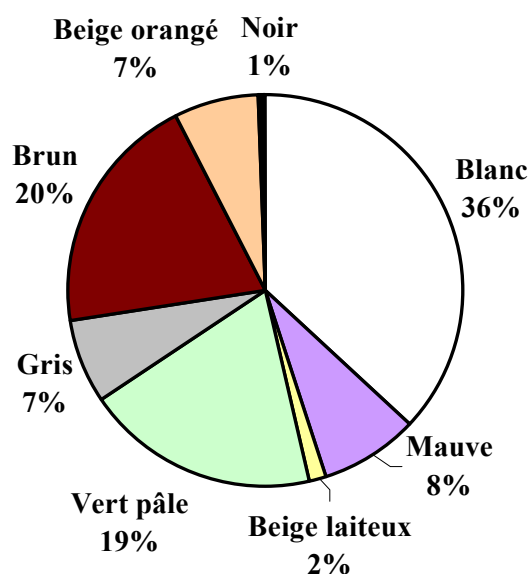


Figure 59 : Couleur des colonies pour les échantillons négatifs.

3.5.3. Discussion

Nous avons comparé les performances obtenues dans notre étude à celles rapportées dans les 3 études précédemment publiées. Les comparaisons sont présentées Tableaux XI (sans coloration de Gram) et XII (avec coloration de Gram).

Les performances obtenues dans notre étude sont comparables à celles obtenues dans les deux études de Ledebøer et al., en termes de sensibilité, spécificité, VPN et VPP [Ledebøer et al., 2007a ; Ledebøer et al., 2007b]. A noter deux différences essentielles pouvant expliquer les variations :

- (i) Ledebøer et al. ont travaillé sur des échantillons de selles ($n = 120$ et $n = 147$), et ont évalué les performances du milieu chromID VRE à un milieu bile-esculine, aux performances moyennes en particulier en terme de spécificité pouvant expliquer les bons résultats obtenus dans cette étude.
- (ii) Notre étude a été menée sur un faible nombre d'écouvillons rectaux, avec un nombre réduit d'ERG+... pouvant expliquer une éventuelle sur-estimation des performances.

Les performances indiquées par l'étude de Delmas et al. (réalisée sur écouvillons rectaux et selles), sont plus faibles que celle obtenues dans notre étude, en particulier lorsque l'on considère la sensibilité et la VPP [Delmas et al., 2007]. Cela peut s'expliquer par une différence de caractéristiques métaboliques et culturelles de nos deux clones épidémiques. Nos données sont par contre concordantes sur divers points :

- (i) l'intérêt de la réalisation d'une coloration de Gram : amélioration +++ de la spécificité et de la VPP.
- (ii) Les levures et les BGN sont les principaux faux positifs à 24 h.
- (iii) A 48 h, on observe la croissance essentiellement d'entérocoques naturellement résistants aux glycopeptides ou d'autres BGP ou CGP, diminuant les performances du milieu chromID.

En conclusion, les données de nos études à la fois préliminaire et prospective, sont concordantes avec celles d'études précédentes. L'originalité de notre approche repose sur le fait que c'est la 1^{ère} étude comparant 3 milieux chromogènes sélectifs entre eux.

Tableau XI : Performances comparées, en l'absence de coloration de Gram.

Performances (%)	Delmas et al., 2007	Notre étude
24 h		
Sensibilité	54,55	100
Spécificité	98,27	98
VPP	41,38	60
VPN	98,98	100
48 h		
Sensibilité	54,55	100
Spécificité	85,08	90
VPP	7,55	30
VPN	98,82	100

Tableau XII : Performances comparées, avec coloration de Gram.

Performances	Delmas et al., 2007	Ledeboer et al., 2007a	Ledeboer et al., 2007b	Notre étude
24 h				
Sensibilité	54,55	96,4	86,3	100
Spécificité	100	96,6	100	100
VPP	100	89,8	100	100
VPN	98,99	97,7	90,8	100
48 h				
Sensibilité	54,55	94,8	88,2	100
Spécificité	97,66	73,9	98,6	96
VPP	34,29	72,4	97,8	50
VPN	98,97	95,8	90,7	100

3.5.4. Conséquences sur le nombre de PCR réalisées

Le changement de milieu (VRE de AES, pour chromID VRE de bioMérieux) nous a permis de réduire de façon significative le nombre de PCR multiplex de confirmation réalisées (Figures 48 et 49), en limitant le nombre de faux positifs : couleur des colonies des contaminants aisément distinguables des colonies suspectes d'ERG, milieu plus sélectif et plus spécifique. De plus, ce milieu permet une identification présomptive de *E. faecium* et *E. faecalis*, et nous a donc permis de nous concentrer sur les colonies violettes, notre clone épidémique étant un *E. faecium vanA*.

Par ailleurs, nous pouvons constater, sur la Figure 60, qu'avec une certaine habitude de lecture, il est facile d'identifier les faux positifs, avec l'aide de la coloration de Gram comme outil très utile. Cela nous a permis de réduire le nombre de PCR.

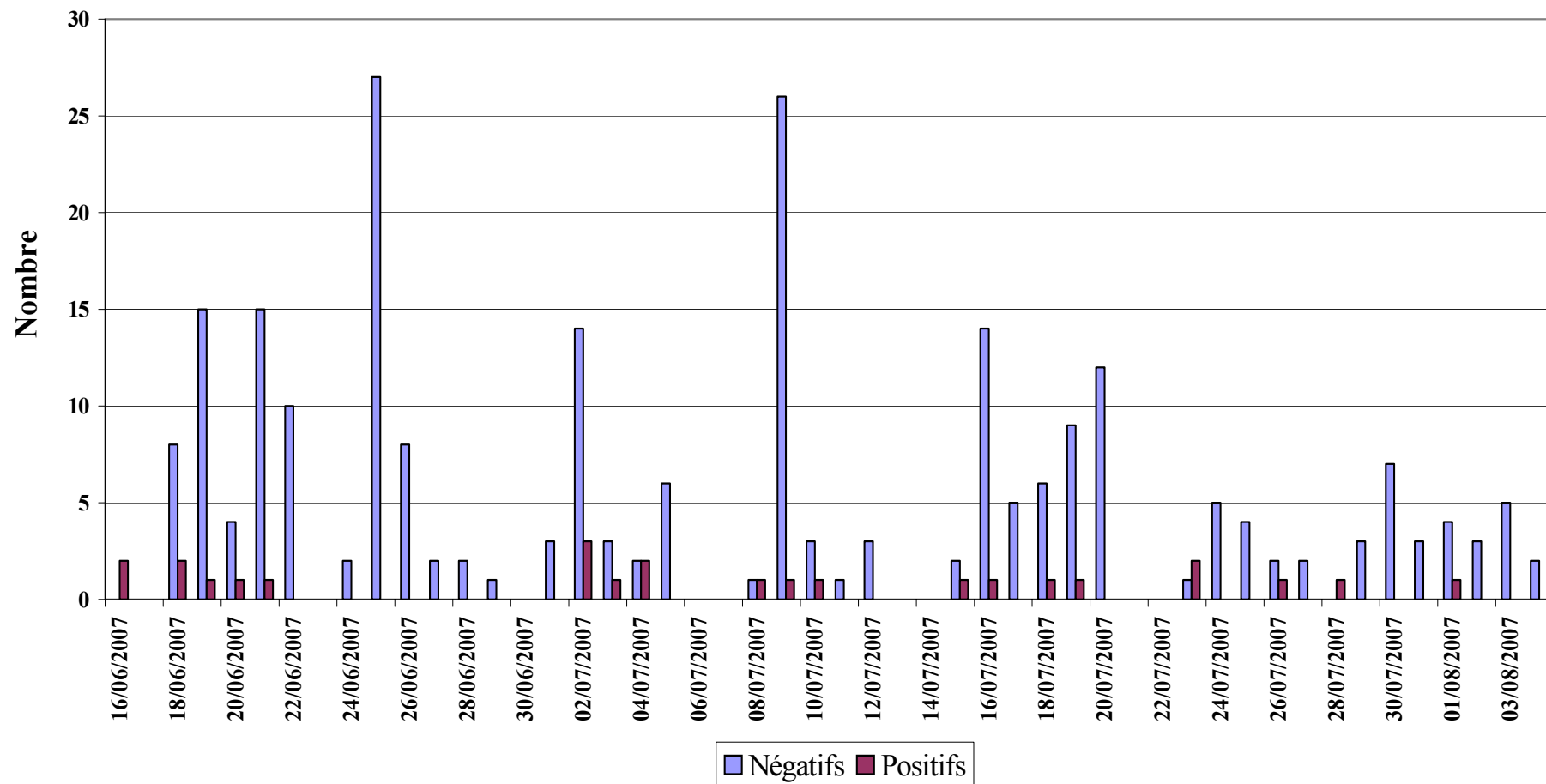


Figure 60 : Nombre de PCR négatives (non ERG) et positives (ERG) réalisées après culture sur milieu chromID VRE, à partir de colonies suspectes (n = 270).

Etude juin-août 2007.

CONCLUSIONS

La faible prévalence observée dans notre étude (4 % pour l'étude préliminaire, 1 % pour l'étude prospective) est proche de celle retrouvée par d'autres auteurs [Delmas et al., 2007]. Cette prévalence est identique à celle actuellement observée pour l'épidémie sévissant au sein du CHU de Nancy, et nous a permis d'évaluer les 3 milieux dans des conditions réelles, de routine (en particulier la fréquence des faux négatifs et des faux positifs).

Parmi les 3 milieux sélectifs chromogènes testés, le principal désavantage du milieu VRE (AES Chemunex) est la nécessité de recourir à des tests complémentaires pour l'identification des isolats et la confirmation de la résistance aux glycopeptides ; cela en raison de la croissance importante de contaminants donnant des colonies bleu-vert identiques à celles des ERG. Réaliser des investigations complémentaires est coûteux en temps technicien, en matériel et financièrement. Ainsi, dans un contexte épidémique, avec un nombre important d'écouvillons rectaux à traiter chaque jour (200 à 300 au plus fort de l'épidémie), l'utilisation d'un tel milieu n'est pas envisageable.

Les milieux ChromAgar VRE (ChromAgar Laboratoires) et chromID VRE (bioMérieux) semblent avoir des performances similaires : de très bonnes sensibilité et VPN, une bonne spécificité, et une VPP plus modérée due à la croissance de contaminants, en particulier après 48 h d'incubation. Ces 1^{ères} données nous ont permis de choisir le milieu chromID VRE pour une étude prospective plus poussée et de confirmer ainsi les 1^{ères} observations, à savoir : (i) que ce milieu présente un bon compromis entre sensibilité/spécificité, facilité/rapidité de lecture ; et que, (ii) l'utilisation d'un tel milieu nécessite 48 h d'incubation et n'élimine pas tout recours à des tests complémentaires. Cela va à l'encontre des recommandations publiées par d'autres auteurs. Ainsi, Ledebøer et al. ont conclu que l'usage du milieu chromID VRE éliminait le besoin de tests biochimiques ou d'antibiogramme supplémentaires, le recours à une coloration de Gram étant suffisant [Ledebøer et al., 2007a ; Ledebøer et al., 2007b]. Delmas et al. ont quant à eux montré que ce milieu est un outil performant, nécessitant une incubation de 24 h et une simple coloration de Gram en complément [Delmas et al., 2007]. Ces divergences semblent dues à une différence de clone épidémique, en terme d'exigence de croissance et de caractères biochimiques. Ainsi, récemment, Fines et al. ont démontré que des isolats

d'ERG avec une CMI à la vancomycine entre 16 et 128 mg/L n'étaient détectés qu'après 48 h d'incubation sur les milieux contenant 8 mg/L de vancomycine (incluant le milieu chromID VRE) [Fines et al., 2007]. Les auteurs recommandent alors de tester les différents milieux à disposition en fonction de chaque clone, en prenant en compte les variations de caractéristiques de croissance et des CMI de la vancomycine. Cependant, comme suggéré par Delmas et al. [Delmas et al., 2007], la réalisation d'une simple coloration de Gram permet d'éliminer 100 % des faux positifs (BGN, BGP, levures) à 24 h, contre seulement 42 % à 48 h. Les faux positifs de type autres CGP, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, nécessitent des investigations complémentaires.

Ainsi, notre étude, menée dans un contexte épidémique, nous a permis d'évaluer le milieu chromID VRE dans un usage de routine. Nous avons montré qu'avec notre clone épidémique *E. faecium vanA*, une incubation de 48 h est nécessaire, afin de ne passer à côté d'aucun patient porteur, et que la coloration de Gram reste une aide précieuse.

Conclusion

Les patients colonisés ou infectés par des ERG apparaissent comme les 1^{ers} réservoirs de la transmission des ERG dans les établissements de santé. Le portage étant en règle générale asymptomatique, ces réservoirs peuvent demeurer inconnus et permettre ainsi une dissémination plus aisée de ces souches, capables de subsister pendant de longues périodes dans l'environnement. Une étude prospective longitudinale chez des patients ventilés en USI a ainsi rapporté une transmission croisée dans 85% des cas, chez des patients initialement non porteurs [Bonten et al., 1996]. La prévalence de colonisation intestinale par des ERG varient selon les études : 2% aux Pays-Bas [Endtz et al., 1997], 3,5% en Belgique [Gordts et al., 1995] et jusqu'à 30,5% en Grèce (mais ils tiennent compte des *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*, naturellement résistants aux glycopeptides) [Metallidis et al., 2006] ; études menées essentiellement dans des services de réanimation ou de chirurgie. En France, les études réalisées dans des établissements de soins, en général de grands centres hospitaliers, ont rapporté une prévalence de 4,9% dans des services de Réanimation [Boisivon et al., 1997], ou de 8,5% lors d'une épidémie en Néphrologie à l'hôpital Bichat à Paris [Lucet et al., 2007].

Plusieurs leçons peuvent être tirées de notre épidémie, ainsi que de celles s'étant déroulées ailleurs en France depuis 2004. En premier lieu, la dissémination rapide des ERG ne s'est pas limitée au service de Néphrologie, mais a concerné aussi, assez rapidement, d'autres services, entraînant une généralisation du problème, avec échec de contrôle de l'épidémie initiale et résurgence en novembre 2006, avec extension à de nombreux établissements de soins lorrains. Ceci peut être expliqué par la combinaison de deux difficultés : (i) la diffusion trop tardive de recommandations et les difficultés à les appliquer uniformément dans tous les établissements ; (ii) la capacité des ERG à coloniser rapidement sous la pression de sélection par les antibiotiques le tube digestif et l'environnement hospitalier, associée à un faible pouvoir pathogène, permettant la constitution de réservoirs occultes et pérennes alors que la fréquence des infections est restée très faible (2 cas d'endocardites, quelques cas d'infections urinaires). Les transferts de patients colonisés (non connus comme porteurs) entre services et entre établissements, a permis au départ une diffusion large de notre clone épidémique « Nancy ». Mais nous avons aussi observé l'émergence d'autres clones, « Thionville » et « Vittel » par

exemple, montrant bien l'imbrication de nombreux facteurs. Le signalement des infections nosocomiales (et des colonisations dans ce contexte), reste l'outil le plus adapté en termes de surveillance et d'alerte s'il est utilisé de manière réactive dans les établissements. Notre expérience a montré que les différentes stratégies de contrôle mises en place sont d'autant plus suivies de succès qu'elles sont appliquées de manière stricte et précoce. Une intervention rapide de type « search and isolate » (dépister et isoler) reste un élément clef, ainsi que la compliance aux procédures d'hygiène et de lavage des mains, à l'aide de solutés hydro-alcooliques. Le contrôle des épidémies passe aussi par la maîtrise de l'utilisation des antibiotiques, en général, et plus particulièrement de ceux sélectionnant les ERG.

Le développement de méthodes sensibles et spécifiques pour le dépistage des colonisations ou infections à ERG, chez un nombre important de patients, simple et facile à mettre en oeuvre, est indispensable au contrôle de la dissémination de ces pathogènes hautement résistants aux antibiotiques. Les méthodes de PCR temps réel ont fait l'objet d'un développement important ces dernières années, en particulier pour le dépistage de BMR telles que les ERG, mais ces techniques sont souvent beaucoup trop coûteuses et complexes pour être mises en oeuvre lors d'une épidémie. Ces techniques n'étaient pas implantées dans notre laboratoire au moment de la résurgence de l'épidémie, et demandaient trop de matériel et de mises au point, pour être installées en urgence. Devant les progrès récents en terme de substrats chromogéniques spécifiques, possédant une sensibilité suffisante pour détecter les ERG au sein d'une flore intestinale polymorphe et abondante, nous avons opté pour cette option, tout en gardant la PCR multiplex comme technique de confirmation. Le milieu chromID VRE (bioMérieux) nous a particulièrement séduit, puisque l'incorporation de deux substrats chromogènes, cibles de deux enzymes spécifiques de *E. faecalis* (α -glucosidase) et de *E. faecium* (β -galactosidase), permet une identification présomptive de ces deux espèces. Au travers des différentes études menées au sein de notre laboratoire, nous avons montré que ce milieu nous permet d'allier sensibilité (avec une lecture après 48 h d'incubation), spécificité (à l'aide de la coloration de Gram, permettant d'éliminer la grande majorité des faux positifs), facilité d'utilisation et de lecture. En

association cette méthode classique de culture à la Biologie Moléculaire (PCR multiplex permettant identification et recherche des gènes de résistance, en confirmation), nous avons mis en place un schéma permettant un dépistage efficient des patients porteurs d'ERG, dans les meilleurs délais. Cependant, concernant les différentes méthodes de dépistage mises en œuvre au cours de cette épidémie, nous avons démontré qu'aucune méthode n'est idéale, que le milieu chromogène sélectif idéal n'existe pas, et que la mise en œuvre d'un dépistage efficace nécessite une évaluation régulière, avec une grande réactivité d'adaptation aux difficultés rencontrées.

Cette épidémie nous a permis de mettre en lumière la nécessité d'existence d'un système multidisciplinaire aux rouages sans faille, et le rôle primordial que peut et que doit jouer le laboratoire de Bactériologie, avec 3 mots clés : réactivité, communication et management.

Bibliographie

1. **Acar J., Casewell M., Freeman J., Friis C., Goossens H.** 2000. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clin Microbiol Infect.* **6**:477-482.
2. **Allen N.E., Le Tourneau D.L., Hobbs Jr J.N., Thompson R.C.** 2002. Hexapeptide derivatives of glycopeptide antibiotics: tools for mechanism of action studies. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:2344-2348.
3. **Al-Obeid S., Billot-Klein D., Van Heijenoort J., Collatz E., Gutmann L.** 1992. Replacement of the essential penicillin-binding protein 5 by high molecular mass PBPs may explain vancomycin- β -lactam synergy in low-level vancomycin resistant *Enterococcus faecium* D366. *FEMS Microbiol Lett.* **91**:79-84.
4. **Arthur M., Molinas C., Depardieu F., Courvalin P.** 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol.* **175**:117-127.
5. **Arthur M., Depardieu F., Molinas C., Reynolds P., Courvalin P.** 1995. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene.* **154**:87-92.
6. **Arthur M., Reynolds P., Courvalin P.** 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiol.* **4**:401-407.
7. **Ballard S.A., Grabsch E.A., Johnson P.D.R., Grayson M.L.** 2005. Comparison of three PCR primer sets for identification of *vanB* gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by *vanB*-containing anaerobic bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:77-81.
8. **Barcia-Macay M., Lemaire S., Mingeot-Leclercq M.-P., Tulkens P.M., Van Bambeke F.** 2006. Evaluation of the extracellular and intracellular activities (human THP-1 macrophages) of telavancin versus vancomycin against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* **58**:1177-1184.

9. **Bates J., Jordens Z., Selkon J.B.** 1993. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. **342**:490-491.
10. **Beauregard D.A., Williams D.H., Gwynn M.N., Knowles D.J.C.** 1995. Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. **39**:781-785.
11. **Beier R.C., Duke S.E., Ziprin R.L., Harvey R.B., Hume M.E., Poole T.L., Scott H.M., Highfield L.D., Alali W.Q., Andrews K., Anderson R.C., Nisbet D.J.** 2008. Antibiotic and disinfectant susceptibility profiles of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) isolated from community wastewater in Texas. *Bull Environ Contam Toxicol*. **80**:188-194.
12. **Biedenbach D.J., Moet G.J., Jones R.N.** 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*. **50**:59-69.
13. **Bischoff W.E., Reynolds T.M., Hall G.O., Wenzel R.P., Edmond M.B.** 1999. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a large urban hospital over a 5-year period. *J Clin Microbiol*. **37**:3912-3916.
14. **Boisivon A., Thibault M., R. Leclercq R.** 1997. Colonization by vancomycin-resistant enterococci in the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin. Microbiol. Inf.* **3**:175-179.
15. **Bonadio M., Meini M., Tagliaferri E., Gigli C., Vigna A.** 2000. Enterococcal glycopeptide resistance at an Italian teaching hospital. *J Antimicrob Chemother*. **46**:129-131.
16. **Bonora M.G., Solbiati M., Stepan E., Zorzi A., Luzzani A., Catania M.R., Fontana R.** 2006. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol*. **44**:1153-1155.
17. **Bonten M.J., Willems R., Weinstein R.A.** 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from ? *Lancet Inf. Dis*. **1**:314-325.

18. **Borgmann S., Schulte B., Wolz C., Gruber H., Werner G., Goerke C., Klare I., Beyser K., Heeg P., Autenrieth I.B.** 2007. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Inf.* 1-7.
19. **Boyce J.M., Mermel L.A., Zervos M.J, Rice L.B., Potter-Bynoe G., Giorgio C., Medeiros A.A.** 1995. Controlling vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **16**:634-637.
20. **Boyd D.A., Du T., Hizon R., Kaplen B., Murphy T., Tyler S., Brown S., Jamieson F., Weiss K., Mulvey M.R., and the canadian nosocomial infection surveillance program.** 2006. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**:2217-2221.
21. **Brown D.J.F., Walpole E.** 2003. Evaluation of selective and enrichment media for isolation of glycopeptide-resistant enterococci from faecal specimens. *J Antimicrob Chemother.* **51**:289-296.
22. **CA-SFM.** Communiqué 2007 (Edition janvier 2007). <http://www.sfm.asso.fr>
23. **Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* **13**:686-707.
24. **Chadwick P.R., Oppenheim B.A.** 1995. Neomycin blood agar as a selective medium for vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Pathol.* **48**:1068-1070.
25. **Chadwick P.R., Woodford N., Kaczmarek E.B., Gray S., Barrell R.A., Oppenheim B.A.** 1996. Glycopeptide-resistant enterococci isolated from uncooked meat. *J Antimicrob Chemother.* **38**:908-909.
26. **Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K., for the vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* investigative team.** 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl Med J.* **348**:1342-1347.

27. **Chavers L.S., Moser S.A., Benjamin W.H., Banks S.E., Steinhauer J.R., Smith A.M., Johnson C.N., Funkhouser E., Chavers L.P., Stamm A.M., Waites K.B.** 2003. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Inf.* **53**:159-171.
28. **Chen Y., Marshall S.A., Winokur P.L., Coffman S.L., Wilke W.W., P.R. Murray, Spiegel C.A., Pfaller M.A., Doern G.V., Jones R.N.** 1998. Use of molecular and reference susceptibility testing methods in a multicenter evaluation of MicroScan dried overnight gram-positive MIC panels for detection of vancomycin-resistant and high-level aminoglycoside resistances in enterococci. *J Clin Microbiol.* **36**:2996-3001.
29. **Coignard B., Thiolet J.M., Lacavé L.** pour le groupe de travail ENP 2006. 2007. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, juin 2006. Résultats préliminaires 12 janvier 2007.
30. **Coombs G.W., Kay I.D., Steven R.A., Pearman J.W., Bertolatti D., Grubb W.B.** 1999. Should genotypic testing be done on all phenotypically vancomycin-resistant enterococci detected in hospitals ? *J Clin Microbiol.* **37**:1229-1230.
31. **Cooper M.A., Williams D.H.** 1999. Binding of glycopeptides antibiotics to a model of a vancomycin-resistant bacterium. *Chem Biol.* **6**:891-899.
32. **Coque T.M., Tomayko J.F., Rieke S.C., Okhyusen P.C., Murray B.E.** 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**:2605-2609.
33. **Courvalin P.** 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis.* **42**:S25-S34.
34. **Courvalin P., Leclercq R., Bingen E.** 2006. AntibioGramme, 2^{ème} édition. Eska éditions, Paris, France.
35. **CTINILS.** 2006. Avis du Comité Technique des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux Soins relatif à la maîtrise de la diffusion des entérocoques résistants aux glycopeptides dans les établissements de santé français, 6 octobre 2005. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* **13**:88-89.

36. **Cui L., Murakami H., Kuwahara-Arai K., Hanaki H., Hiramatsu K.** 2000. Contribution of thickened cell wall and its glutamine nonaminated component to vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:2276-2285.
37. **Cui L., Ma X., Sato K., Okuma K., Tenover F.C., Mamizuka E.M., Gemmell C.G., Kim M-N., Ploy M-C., Sohl N.E., Ferraz V., Hiramatsu K.** 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **41**:5-14.
38. **Cui L., Iwamoto A., Lian J-Q., Neoh H-M., Maruyama T., Horikawa Y., Hiramatsu K.** 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**:428-438.
39. **D'Agata E.M.C., Gautam S., Green W.K., Tang Y.-W.** 2002. High rate of false negative results of the rectal swabs culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* **34**:167-172.
40. **De Bruin M.A., Riley L.W.** 2007. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant *Enterococcus* infection and colonization in hospitals ? A systematic review. *BMC Inf Dis.* **7**:24-34.
41. **Delmas J., Robin F., Romaszko J.-P., Baraduc R., Lesens O., Sirot J., Bonnet R.** 2005. Utilisation de la gélose VCA3 (bioMérieux) pour l'isolement sélectif des enterococci résistants à la vancomycine à partir des prélèvements rectaux. *Pathol Biol.* **53**:485-489.
42. **Delmas J., Robin F., Schweitzer C., Lesens O., Bonnet R.** 2007. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID VRE, for the detection of vancomycin-resistant enterococci from stool and rectal swabs. *J Clin Microbiol.* **45**:2731-2733.

43. **De Niederhäusern S., Sabia C., Messi P., Guerrieri E., Manicardi G., Bondi M.** 2007. VanA-Type vancomycin-resistant enterococci in equine and swine rectal swabs and in human clinical samples. *Curr Microbiol.* **55**:240-246.

44. **Depardieu F., Reynolds P.E., Courvalin P.** 2003a. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:7-18.

45. **Depardieu F., Courvalin P., Msadek T.** 2003b. A six amino acid deletion, partially overlapping the VanS_B G2 ATP-binding motif, leads to constitutive glycopeptide resistance in VanB-type *Enterococcus faecium*. *Mol Microbiol.* **50**:1069-1083.

46. **Depardieu F., Courvalin P.** 2005. Glycopeptide resistance in Enterococci. In. White D.G., Alekshun M.N., McDermott P.F (Editors) "Frontiers in Antimicrobial Resistance: a tribute to Stuart B. Levy".

47. **Deshpande L.M., Fritsche T.R., Moet G.J., Biedenbach D.J., Jones R.N.** 2007. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe : a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **58**:163-170.

48. **DiazGranados C.A., Jernigan J.A.** 2005. Impact of vancomycin-resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection. *J Infect Dis.* **191**:588-595.

49. **Domingo M.-C., Huletsky A., Giroux R., Picard F.J., Bergeron M.G.** 2007. Characterization of the *vanD* and *vanG*-like gene clusters in a *Ruminococcus* species isolated from the human bowel flora. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**:4111-4117.

50. **Donnelly J.P., Voss A., Witte W., Murray B.E.** 1996. Does use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics, influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans ? *J Antimicrob Chemother.* **37**:389-390.

51. **Donskey C.J., Hanrahan J.A., Hutton R.A., Rice L.B.** 2000. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med.* **343**:1925-1932.
52. **Drees M., Snyderman D.R., Schmid C.H., Barefoot L., Hansjosten K., Vue P.M., Cronin M., Nasraway S.A., Golan Y.** 2008. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* **46**:678-685.
53. **Drews S.J., Johnson G., Gharabaghi F., Roscoe M., Matlow A., Tellier R., Richardson S.E.** 2006. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* **44**:1578-1580.
54. **Duerden M.E., Bergeron J., Baker R.L., Braddon R.L.** 1997. Controlling the spread of vancomycin-resistant enterococci with a rehabilitation cohort unit. *Arch Phys Med Rehabil.* **78**:553-555.
55. **Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* **33**:24-27.
56. **Edwards J.R., Peterson K.D., Andrus M.L., Tolson J.S., Goulding J.S., Dudeck M.A., Mincey R.B., Pollock D.A., Horan T.C., and the NHSN facilities, Atlanta, Georgia.** 2007. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2006, issued June 2007. *Am J Infect Control.* **35**:290-301.
57. **Endtz, H.P., Van den Braak N., Van Belkum A., Kluytmans J.A., Koeleman J.G., Spanjaard L., Voss, A. Weersink A.J., Vandenbroucke-Grauls C.M., Buitting A.G., van Duin A., Verbrugh H.A.** 1997. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3026-3031.
58. **Ergani-Ozcan A., Naas T., Baysan B.O., Ogunc D., Inan D., Colak D., Nordmann P.** 2008. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* **61**:1033-1039.

59. **European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Annual Report 2005.** Data summary from January 1999 through December 2005, issued September 2006. www.rivm.nl/earss
60. **Eckstein B.C., Adams D.A., Eckstein E.C., Rao A., Sethi A.K., Yadavalli G.K., Donskey C.J.** 2007. Reduction of *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. BMC Inf Dis. 7:61-66.
61. **Eigner U., Fahr A., Weizenegger M., Witte W.** 2005. Evaluation of a new molecular system for simultaneous identification of four *Enterococcus* species and their glycopeptide resistance genotypes. J Clin Microbiol. 43:2920-2922.
62. **Fauchère, J.L., J.L. Avril.** 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses éditions, Paris, France.
63. **Fines M., Bourdon N., Leclercq R.** 2007. Etude comparative de 6 géloses sélectives pour la détection des principaux clones d'entérocoques résistants aux glycopeptides circulant en France. Abstract 445/70P, 27^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, RICAI, Paris, France, 7-8 décembre 2007.
64. **Flannagan S.E., Chow J.W., Donabedian S.M., Brown W.J., Perri M.B., Zervos M.J., Ozawa Y., Clewell D.B.** 2003. Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with VanA phenotype. Antimicrob Agents Chemother. 47:3954-3959.
65. **Fluit A.D.C., Maarten R.V., Schmitz F.J.** 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 14:836-871.
66. **Ford M., Perry J.D., Gould F.K.** 1994. Use of cephalixin aztreonam arabinose agar for the selective isolation of *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 32:2999-3001.
67. **Freitas M.C.S., Pacheco-Silva A., Barbosa D., Silbert S., Sader H., Sesso R., Camargo L.F.A.** 2006. Prevalence of vancomycin-resistance *Enterococcus* fecal colonization among kidney transplant patients. BMC Inf Dis. 6:133-139.

68. **Freney J., Renaud F., Leclercq R., Riegel P.** 2007. Précis de Bactériologie Clinique. 2ème édition. Editions ESKA, éditions Alexandre Lacassagne, Paris, France.
69. **Fujita N., Yoshimura M., Komori T., Tanimoto K., Ike Y.** 1998. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. Antimicrob Agents Chemother. **42**:2150.
70. **Furano J.P., Perencevich E.N., Johnson J.A., Wright M.O., McGregor J.C., Morris J.G., Strauss S.M., Roghman M-C., Nemoy L.L., Standiford H.C., Hebden J.N., Harris A.D.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci co-colonization. Emerg Inf Dis. **11**:1539-1544.
71. **Ge M., Chen Z., Onishi H.R., Kohler J., Silver L.L., Kerns R., Fukuzawa S., Thompson C., Kahne D.** 1999. Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding DAla-DAla. Science. **284**:507-511.
72. **Ghidan A., Kaszanyitzky E.J., Dobay O., Nagy K., Amyes S.G., Rozgonyi F.** 2008. Distribution and genetic relatedness of vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from healthy slaughtered chickens in Hungary from 2001 to 2004. Acta Vet Hung. **56**:13-25.
73. **Goossens H., Jabes D., Rossi R., Lammens C., Privitera G., Courvalin P.** 2003. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. J Antimicrob Chemother. **51**:S5-S12.
74. **Gordts B., Van Landuyt H., Ieven M., Vandamme P., Goossens H.** 1995. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. J. Clin. Microbiol. **33**:2842-2846.
75. **Grabsch E.A., Chua K., Xie S., Byrne J., Ballard S.A., Ward P.B., Grayson M.L.** 2008. *vanB2* *Enterococcus faecium* with vancomycin susceptible phenotype-improved detection by Etest using Oxgall supplementation.. J Clin Microbiol. In press.

76. **Green M., Barbadora K., Michaels M.** 1991. Recovery of vancomycin-resistant Gram-positive cocci from pediatric liver transplant recipients. *J Clin Microbiol.* **29**:2503-2506.
77. **Guardabassi L., Perichon B. Van Heijenoort J., Blanot D., Courvalin P.** 2005. Glycopeptide resistance *vanA* operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:4227-4233.
78. **Guérin F., Perrier-Grosclaude J.D., Foissaud V., Masseron T., Thierry J.** 1998. Vancomycin-resistant *Enterococcus* in France. High prevalence in a young ambulatory care patient population. *Presse Med.* **27**:1427-1429.
79. **Hayden M.K., Bonten M.J.M., Blom D.W., Lyle E.A., Van de Vijver D.A.M.C., Weinstein R.A.** 2006. Reduction in acquisition of vancomycin-resistant *Enterococcus* after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clin Inf Dis.* **42**:1552-1560.
80. **Hershberger E., Donabedian S., Konstantinou K., Zervos M.J.** 2004. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. *Clin Infect Dis.* **38**:92-98.
81. **Higgins D.L., Chang R., Debabov D.V., Leung J., Wu T., Krause K.M., Sandvick E., Hubbard J.M., Kaniga K., Schmidt D.E., Gao Q., Cass R.T., Karr D.E., Benton B.M., Humphrey P.P.** 2005. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:1127-1134.
82. **Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., Kawasaki S., Hosoda Y., Hori S., Fukuchi Y., Kobayashi I.** 1997a. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* **350**:1670-1673.
83. **Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover F.C.** 1997b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* **40**:135-136.

84. **Homan W.L., Tribe D., Poznanski S., Li M., Hogg G., Spalburg E., Van Embden J.D.A., Willems R.J.L.** 2002. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. **40**:1963-1971.
85. **Ieven M., Vercauteren E., Descheemaeker P., Van Laer F., Goossens H.** 1999. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. J Clin Microbiol. **37**:1436-1440.
86. **Isakow W., Morrow L.E., Kollef M.H.** 2007. Probiotics for preventing and treating nosocomial infections. Chest. **132**:286-294.
87. **Jayaratne P., Rutherford C.** 1999. Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. J Clin Microbiol. **37**:2090-2092.
88. **Kacica M., McDonald L.C.** 2004. Brief Report: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, New York 2004. MMWR.**52**:322-323.
89. **Karlowsky J.A., Jones M.E., Draghi D.C., Thornsberry C., Sahm D.F., Volturo G.A.** 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. Am Clin Microbiol Antimicrob. **3**:7-14
90. **Kawalec M., Kedzierska J., Gadjia A., Sasowy E., Wegrzyn J., Naser S., Skotnicki A.B., Gniadkowski M., Hryniewicz W.** 2007. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect. **13**:893-901.
91. **Kramer A., Schwebke I., Kampf G.** 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces ? A systematic review. BMC Inf Dis. **6**:130-137.
92. **Kurup A., Chlebicki M.P., Ling M.L., Koh T.H., Tan K.Y., Lee L.C., Howe K.B.M.** 2008. Control of a hospital-wide vancomycin-resistant *Enterococci* outbreak. Am J Infect Control. **36**:206-211.

93. **Lai K.K., Fontecchio S.A., Kelley A.L., Melvin Z.S., Baker S.** 1997. The epidemiology of fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **18**:762-765.
94. **Lai K.K., Fontecchio S., Melvin Z., Baker S.P.** 2006. Impact of alcohol-based, waterless hand antiseptic on the incidence of infection and colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **27**:1018-1021.
95. **Landman D., Quale J.M., Oydna E., Willey B., Ditore V., Zaman M., Patel K., Saurina G., Huang W.** 1996. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* **34**:751-752.
96. **Leavis H.L., Bonten M.J.M., Willems R.J.L.** 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* **9**:454-460.
97. **Leclercq R., Derlot E., Duval J., Courvalin P.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanine in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* **319**:157-161.
98. **Leclercq R., Dutka-Malen S., Duval J., Courvalin P.** 1992. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**:2005-2008.
99. **Leclercq R., Coignard B.** pour le groupe d'expertise Entérocoques résistants aux glycopeptides. 2006. Les entérocoques résistants aux glycopeptides : situation en France en 2005. *BEH.* **13**:85-87.
100. **Ledeboer N.A., Das K., Eveland M., Royer-Dalbert C., Mailler S., Chatellier S., Dunne W.M.** 2007a. Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol.* **45**:1556-1560.
101. **Ledeboer N.A., Tibbetts R.J., Dunne W.M.** 2007. A new chromogenic medium, chromID VRE, to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Diagn Microbiol Inf Dis.* Sept 20. In press.

102. **Lee D.K., Kim Y., Park K.S., Yang J.W., Kim K., Ha N.J.** 2007. Antimicrobial activity of mupirocin, daptomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and tigecycline against vancomycin-resistant enterococci (VRE) from clinical isolates in Korea (1998 and 2005). *J Biochimie Mol Biol.* **40**:881-887.
103. **Lepelletier D., Perron S., Huguenin H., Picard M., Bemer P., Caillon J., Juvin M.E., Drugeon H.B.** 2004. Which strategies follow from the surveillance of multidrug-resistant bacteria to strengthen the control of their spread? A french experience. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **25**:162-176.
104. **Lepoutre A., Branger B., Garreau N., Boulétreau A., Ayzac L., Carbonne A., Maugat S., Gayet S., Hommel C., Parneix P., Tran B.** 2004. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales en France (2001) reported through the Réseau National de Surveillance et d'Investigation des Infections Nosocomiales (RAISIN), Institut de Veille Sanitaire (InVS). <http://www.invs.sante.fr>.
105. **Lindstedt B.A.** 2005. M Multiple-locus variable number tandem repeats analysis genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis.* **26**:2567-2582.
106. **Livornese L.L.J., Dias S., Samel C.** 1992. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med.* **117**:112-116.
107. **Long J.K., Choueiri T.K., Hall G.S., Avery R.K., Sekeres M.A.** 2005. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc.* **80**:1215-1216.
108. **Lu J.J., Perng C.L., Chiueh T.S., Lee S.Y., Chen C.H., Chang F.Y., Wang C.C., Chi W.M.** 2001. Detection and typing of vancomycin-resistance genes of enterococci from clinical and nosocomial surveillance specimens by multiplex PCR. *Epidemiol Infect.* **126**:357-363.
109. **Lucet J-C., Armand-Lefevre L., Laurichesse J.-J., Macrez A., Papy E., Ruimy R., Deblangy C., Lozach A., Lolom I., Jarlier V., Andreumont A., Leport C.** 2007. Rapid control of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a French university hospital. *J Hosp Inf.* 1-7.

110. **Malachowa N., Sabat A., Gniadkowski M., Krzyszton-Russjan J., Empel J., Miedzobrodzki J., Kosowska-Shick K., Appelbaum P.C., Hryniewicz W.** 2005. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* **43**:3095-3100.
111. **Manley K.J., Fraenkel M.B., Mayall B.C., Power D.A.** 2007. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *MJA.* **186**:454-457.
112. **McDonald J.R., Engemann J.J., Kaye K.S., Sexton D.J.** 2004. Co-infection or co-colonization with vancomycin-resistant Enterococci and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a network of community hospitals. *Inf Cont Hosp Epidemiol.* 622.
113. **Mercier R.C., Hrebickova L.** 2005. Oritavancine: a new avenue for resistant Gram-positive bacteria. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* **3**:325-332.
114. **Metallidis S., Chatzidimitriou, M. Tsona, A., Bisikis A., Larazaki G., Koumentaki E., Gikas A., Alexiou-Daniel S., Nikolaidis P.** 2006. Vancomycin-resistant enterococci, colonizing the intestinal tract of patients in a University Hospital in Greece. *Braz. J. Inf. Dis.* **10**:179-184.
115. **Miele A., Bandera M., Goldstein B.P.** 1995. Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in enterococci and to study gene organization in VanA isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**:1772-1778.
116. **Montecalvo M.A., Horowitz H., Gedris C., Carbonaro C., Tenover F.C., Issah A., Cook P., Wormser G.P.** 1994. Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus* bacteriemia in an adult oncology unit. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**:1363-1367.
117. **Morris J.G., Shay D.K., Hebden J.N., McCarter R.J., Perdue B.E., Jarvis W., Johnson J.A., Dowling T.C., Polish L.B., Schwalbe R.S.** 1995. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med.* **123**:250-259.

118. **Naas T., Fortineau N., Snanoudj R., Spicq C., Durrbach A., Nordmann P.** 2005. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a VanD-like phenotype associated with a vanA genotype. *J Clin Microbiol.* **43**:3642-3649.
119. **Navarro F., Courvalin P.** 1994. Analysis of genes encoding D-Alanine-D-Alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**:1788-1793.
120. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report.** 2004. Data summary from January 1992 through June 2004. *Am J Infect Control.* **32**:470-85.
121. **Noskin G.A, Stosor V., Cooper I., Peterson L.R.** 1995. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **16**:577-581.
122. **Novais C., Freitas A.R., Sousa J.C., Baquero F., Coque T.M., Peixe L.V.** 2008. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:1001-1008.
123. **Novicki T.J., Schapiro J.M., Ulness B.K., Sebeste A., Busse-Johnston L., Swanson K.M., Swanzy S.R., Leisenring W., Limaye A.P.** 2004. Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus* from fecal material. *J Clin Microbiol.* **42**:1637-1640.
124. **Olivier C.N., Blake B.K., Steed L.L., Salgado C.D.** 2008. Risk of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) bloodstream infection among patients colonized with VRE. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **29**:404-409.
125. **Ostrowsky B.E., Venkataraman L., D'Agata E.M.C., Gold H.S., DeGirolami P.C., Samore M.H.** 1999. Vancomycin-resistant enterococci in Intensive Care Units. *Arch Intern Med.* **159**:1467-1472.
126. **Pace J.L., Yang G.** 2006. Glycopeptides : update on an old successful antibiotic class. *Bioch Pharmacol.* **71**:968-980.

127. **Palladino S., Kay I.D., Flexman J.P., Boehm I., Costa A.M.G., Lambert E.J., Christiansen K.J.** 2003. Rapid detection of *vanA* and *vanB* genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* **41**:2483-2486.
128. **Patel R., Uhl J.R., Kohner P., Hopkins M.K., Cockerill F.R.** 1997. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC1* and *vanC2/C3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol.* **35**:703-707.
129. **Paterson D.L., Muto C.A., Ndirangu M., Linden P.K., Potoski B.A., Capitano B., Bonomo R.A., Aron D.C., Donskey C.J.** 2007. Acquisition of vancomycin-resistant *Enterococcus* rectal colonization among intensive care unit patients treated with piperacillin/tazobactam versus cefepime-containing regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* In press.
130. **Pearman J.W., Perry P.L., Kosaras F.P., Douglas C.R., Lee R.C., Peterson A., Terri Orrell C., Khinsoe C.H., Heath C.H., Christiansen K.J.** 2003. Screening and electronic labelling of ward contacts of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanB* carriers during a single-strain hospital outbreak and after discharge from hospital. *Commun Dis Instell.* **27**:97-102.
131. **Perry J.D., Freydière A.M.** 2007. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol.* **103**:2046-2055.
132. **Petrich A.K., Luinistra K.E., Groves D., Chernesky M.A., Mahony J.B.** 1999. Direct detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin-resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. *Mol Cell Probes.* **13**:275-281.
133. **Petsaris O., Mischczak F., Gicquel-Bruneau M., Perrin-Guyomard A., Humbert F., Sanders P., Leclercq R.** 2005. Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chicken. *Appl Environ Microbiol.* **43**:3642-3649.
134. **Pittet D., Mourouga P., Perneger T.V.** 1999. Compliance with handwashing in a teaching hospital. Infection Control Program. *Ann Intern Med.* **130**:126-130.

135. **Pourshafie M.R., Talebi M., Saifi M., Katouli M., Eshraghi S., Kühn I., Möllby R.** 2008. Clonal heterogeneity of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with unique *vanS*. *Tropic Med Int Health*. **13**:722-727.
136. **Ray A.J.** 2002. Nosocomial transmission of vancomycin-resistant enterococci from surfaces. *JAMA*. **287**:1400-1401.
137. **Reynolds P.E., Courvalin P.** 2005. Vancomycin-resistance in Enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Serine. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**:21-25.
138. **Rice L.B., Lakticova V., Helfand M.S., Hutton-Thomas R.** 2004. *In vitro* antienterococcal activity explains associations between exposures to antimicrobial agents and risk of colonization by multiresistant enterococci. *J Inf Dis*. **190**:2162-2166.
139. **Roger M., Faucher M.C., Forest P., St-Antoine P., Coutlée F.** 1999. Evaluation of *vanA*-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak. *J Clin Microbiol*. **37**:3348-3349.
140. **Sakka V., Tsiodras S., Galani L., Antoniadou A., Souli M., Galani I., Pantelaki M., Siafakas N., Zerva L., Giamarellou H.** 2008. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin resistant enterococci. *Clin Microbiol Infect*. In press.
141. **Sahm D.F., Kissinger J., Gilmore M.S.** 1989. *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. **33**:1588-1591.
142. **Sahm D.F., Marsilio M.K., Piazza G.** 1999. Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates : electronic surveillance with the Surveillance Network Database – USA. *Clin Infect Dis*. **29**:259-263.
143. **Satake S., Clark N., Rimland D., Nolte F.S., Tenover F.C.** 1997. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol*. **35**:2325-2330.

144. **Schmitt J.L., Leclercq R., Scheimberg A., Landauer D.** 1994. Approche épidémiologique et clinique des entérocoques : résultats d'une enquête. *Med Mal Inf.* **24**:141-148.
145. **Schulte B., Heininger A., Autenrieth I.B., Wolz C.** 2007. Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Epidemiol Infect.* **25**:1-3.
146. **Seltzer E., Dorr M.B., Goldstein B.P., Perry M., Dowell J.A., Henkel T.** 2003. Dalbavancin skin and soft-tissue infection study group, one-weekly dalbavancin versus standard-of-care antimicrobial regimens for treatment of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis.* **37**:1298-1303.
147. **Severin A., Tabei K., Tenover F., Chung M., Clarke N., Tomasz A.** 2004. High level of oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. **279**:3398-3407.
148. **Shadel B.N., Puzniak L.A., Gillespie K.N., Lawrence S.J., Kollef M., Mundy L.M.** 2006. Surveillance for vancomycin-resistant enterococci: type, rates, costs, and implications. *Inf Cont Hosp Epidemiol.* **27**:1068-1075.
149. **Smith T.L., Pearson M.L., Wilcox K.R., Cruz C., Lancaster M.V., Robinson-Dunn B., Tenover F.C., Zervos M.J., Band J.D., White E., Jarvis W.R.,** for the glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* working group. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *New Engl J Med.* **340**:493-501.
150. **Sohn A.H., Ostrowsky B.E., Sinkowitz-Cochran R.L., Quirk S.B., Jarvis W.R.** 2001. Evaluation of a successful vancomycin-resistant *Enterococcus* prevention intervention in a community of health care facilities. *Am J Infect Control.* **29**:53-57.

151. Song J-H., Ko K.S., Suh J.Y., Oh W. S., Kang C-I., Chung D.R., Peck K.R., Lee N.Y., Lee W.G. 2008. Clinical implications of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) with VanD phenotype and vanA genotype. J Antimicrob Chemother. **61**:838-844.
152. Stamper P.D., Cai M., Lema C., Eskey K., Carroll K.C. 2007. Comparaison of BD GeneOhm® VanR assay to culture for the identification of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in rectal and stool specimens. J Clin Microbiol. **45**:3360-3365.
153. Stryjewski M.E., O’Riordan W.D., Lau W.K., Pien F.D., Dunbar L.M., Vallee M., Fowler V.G., Chu V.H., Spencer E., Barriere S.L., Kitt M.M., Cabell C.H., Corey G.R. 2005. Telavancine versus standard therapy for treatment of complicated skin and soft-tissue infections due to Gram-positive bacteria. Clin Infect Dis. **40**:1601-1607.
154. Swenson J.M., Clark N.C., Ferraro M.J., Sahm D.F., Doern G., Pfaller M.A., Reller L.B., Weinstein M.P., Zabransky R.J., Tenover F.C. 1994. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. **32**:1700-1704.
155. Talebi M., Rahimi F., Katouli M., Möllby R., Pourshafie M.R. 2008. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. Curr Microbiol. **56**:468-473.
156. Tenover F.C., Weigel L.M., Appelbaum P.C., McDougal L.K., Chaitram J., McAllister S., Clark N., Killgore G., O’Hara C.M., Jevitt L., Patel J.B., Bozdogan B. 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. **48**:275-280.
157. Top J., Schouls L.M., Bonten M.J.M., Willems R.J.L. 2004. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. J Clin Microbiol. **42**:4503-4511.
158. Top J., Willems R., Bonten M. 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. **52**:287-308.

159. **Tornieporth N.G., Roberts R.B., John J., Hafner A., Riley L.W.** 1996. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. **23**:767-772.
160. **Uttley A.H.C., Collins C.H., Naidoo J., George R.C.** 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. **1**:57-58.
161. **Van Horn K.G., Gedris C.A., Rodney K.M., Mitchell J.B.** 1996. Evaluation of commercial vancomycin agar screen plates for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*. **34**:2042-2044.
162. **Venkatesh A.K., Lankford M.G., Rooney D.M., Blachford T., Watts C.M., Noskin G.A.** 2008. Use of electronic alerts to enhance hand hygiene compliance and decrease transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus* in a hematology unit. *Am J Infect Control*. In press.
163. **Vergis E.N., Hayden M.K., Chow J.W., Snyderman D.R., Zervos M.J., Linden P.K., Wagener M.M., Schmitt B., Muder R.R.** 2001. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. *Ann Intern Med*. **135**:484-492.
164. **Warren D.K., Nitin A., Hill C., Fraser V.J., Kollef M.H.** Occurrence of co-colonization or co-infection with vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **25**:99-104.
165. **Weigel L.M., Clewell D.B., Gill S.R., Clark N.C., McDougal L.K., Flannagan S.E., Kolonay J.F., Shetty J., Killgore G.E., Tenover F.C.** 2003. Genetic analysis of high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. **302**:1569-1571.
166. **Werner G., Willems R.J., Hildebrandt B., Klare I., Witte W.** 2003. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. **41**:1499-1506.

167. **Werner G., Klare I., Witte W.** 2007a. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. BMC Microbiol. **7**:28-37.
168. **Werner G., Klare I., Fleige C., Witte W.** 2007b. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of *vanA* clusters. Int J Med Microbiol. In press.
169. **Whitener C.J., Park S.Y., Browne F.A., Parent L.J., Julian K., Bozdogan B., Appelbaum P.C., Chaitram J., Weigel L.M., Jernigan J., McDougal L.K., Tenover F.C., Fridkin S.K.** 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. Clin Infect Dis. **38**:1049-1055.
170. **Willems R.J.L, Top J., Van Santen M., Robinson D.A., Coque T.M., Baquero F., Grundmann H., Bonten M.J.M.** 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg Infect Dis. **11**:821-828.
171. **Yang K.-S., Fong Y.-T., Lee H.-Y., Kurup A., Koh T.-H., Koh D., Lim M.-K.** 2007. Predictors of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) carriage in the first major VRE outbreak in Singapore. Ann Acad Med Singapore. **36**:379-383.
172. **Yoo J.H., Lee D.G., Choi S.M., Choi J.H., Shin W.S., Kim M., Yong D., Lee K., Min W.S., Kim C.C.** 2005. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia in a hematology unit: molecular epidemiology and analysis of clinical course. J Korean Med Sci. **20**:169-176.
173. **Zheng B., Tomita H., Hong Xiao Y., Wang S., Li Y., Ike Y.** 2007. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Mainland China. **45**:2813-2818.

174. **Zhou Q., Moore C., Eden S., Tong A., McGeer A for the Mount Sinai Hospital Infection Control Team.** 2008. Factors associated with acquisition of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in roommate contacts of patients colonized or infected with VRE in a tertiary care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **29**:398-403.

175. **Zirakzadeh A., Gastineau D.A., Mandrekar J.N., Nurke J.P., Johnston P.B., Patel R.** 2008. Vancomycin-resistant enterococcal colonization appears associated with increased mortality among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* In press.

Annexes

Annexe 1 : Plaquette explicative à l'attention des patients

Pour toute demande de renseignements supplémentaires, consulter le médecin qui s'occupe de vous dans le service où vous êtes (ou avez été) hospitalisé(e), un membre du Service d'Hygiène hospitalière, votre médecin traitant ou un membre de la Cellule régionale d'Hygiène si vous êtes hospitalisé(e) hors du CHU.

SERVICE D'HYGIENE HOSPITALIERE

CHU DE NANCY
Hôpital de Brabois
Rue du Morvan
54500 VANDOEUVRE les NANCY
Tél : 03 83 15 34 73

CELLULE REGIONALE D'HYGIENE DE LORRAINE

Rue du Morvan
54500 VANDOEUVRE les NANCY
Tél : 03 83 15 39 54

Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)



Ce document est complémentaire à la plaquette « L'Hygiène à domicile »
éditée par la Cellule régionale d'hygiène de Lorraine.

Que sont les entérocoques ?

Les entérocoques sont des bactéries qu'on trouve habituellement dans l'intestin et les selles, ou sur les parties génitales des personnes.

En général, les entérocoques ne causent pas d'infections chez les gens en bonne santé. Parfois, ils peuvent causer des infections urinaires, des infections de plaies et, plus rarement, des infections du sang. Ces infections sont acquises lors d'un séjour dans un établissement de soins et peuvent être traitées par une combinaison d'antibiotiques.

Annexe 1 : Plaquette explicative à l'attention des patients

Qu'est-ce que les ERV (Entérocoques Résistants à la Vancomycine) ?

Les entérocoques peuvent développer une résistance à plusieurs antibiotiques dont la vancomycine. Les ERV ne causent en général pas d'infections, sauf chez les patients très affaiblis, mais ils peuvent dans ce cas nécessiter un traitement plus difficile et plus long.

Comment les ERV sont-ils détectés?

Un échantillon de selles ou un prélèvement rectal analysé en laboratoire permet de déterminer la présence de cette bactérie. On dit que le patient est **porteur** ou **colonisé** s'il y a présence de la bactérie sans aucun signe d'infection et **infecté** s'il y a présence de signes d'infection (ex. : symptômes urinaires, plaie avec rougeur au pourtour, écoulement de pus).

Comment les ERV se transmettent-ils?

Les ERV se transmettent d'un patient porteur à un autre patient par les **maines contaminées** du personnel soignant. Le personnel se contamine les mains lors des soins au patient ou en touchant à certains objets de l'environnement contaminés par le patient (ex. : toilettes, poignées de porte, interrupteurs). C'est pourquoi la meilleure protection est le **lavage des mains** par le personnel soignant et par le patient.

Le risque de transmission d'ERV d'une personne porteuse à des membres de sa famille, incluant les femmes enceintes et les enfants, est très faible.

Pendant combien de temps les ERV restent-ils présents dans les selles?

Les ERV peuvent rester dans les selles pendant plusieurs semaines, parfois des mois. Les personnes porteuses peuvent donc l'être encore au moment d'une nouvelle admission à l'hôpital.

Quelles précautions seront prises au moment d'une hospitalisation?

Il est important d'aviser le **personnel soignant** si une personne est porteuse d'ERV lors d'une admission ou d'une consultation soit à l'hôpital, soit en centre d'hébergement afin que les mesures nécessaires pour la protection des autres patients soient prises.

La personne porteuse d'ERV sera placée, si possible, dans une chambre individuelle avec toilettes privées et des précautions particulières seront prises (ex. : port de gants, blouse).

De plus, un échantillon de selles ou un prélèvement rectal sera régulièrement fait afin de vérifier si la personne est toujours porteuse de cette bactérie.

Comment prévenir la transmission des ERV à la maison?

Le moyen le plus efficace et le plus simple est que la personne porteuse et les membres de sa famille **se lavent les mains régulièrement**. Les ERV ne sont pas plus dangereux que les autres bactéries retrouvées normalement chez les personnes que l'on côtoie tous les jours.

Certains objets ou surfaces de l'environnement, souvent touchés par la personne porteuse, peuvent être contaminés. On devra donc nettoyer la chambre et la salle de bain en utilisant un désinfectant. On peut utiliser de l'eau de Javel diluée (vous diluez un volume d'eau de Javel prête à l'emploi (non concentrée) dans 9 fois ce volume d'eau : par ex. 100mL eau de Javel + 900mL eau).

Les objets et les surfaces le plus souvent contaminés sont les **toilettes, la cuvette des toilettes, la barre de soutien, la poignée de la chasse d'eau, les poignées de porte, les interrupteurs, la table de chevet et le téléphone**. Tous ces objets peuvent être passés à l'eau de Javel. Il n'y a pas de mesure particulière à prendre pour la vaisselle et les ustensiles.

Le lavage des vêtements d'une personne porteuse d'ERV peut se faire de façon habituelle avec un détergent commercial courant en utilisant de l'eau chaude (60°).

S'il y a une personne malade à la maison dont le système de défense est affaibli, il faut en aviser le médecin ou l'infirmière avant le retour à la maison de la personne porteuse d'ERV car des mesures supplémentaires pourraient être nécessaires.

Vous recevez des soins à domicile?

Le personnel soignant qui donne des soins à domicile aux patients porteurs d'ERV doit prendre des précautions particulières afin de ne pas transmettre la bactérie à d'autres patients. L'utilisation de gants et d'une blouse peut être nécessaire dans certaines circonstances.

Prévenir impérativement son médecin traitant et son infirmière libérale.

Quand doit-on se laver les mains en présence d'ERV?

- après être allé aux toilettes ;
- avant et après avoir donné des soins à la personne porteuse ;
- après tout contact avec l'environnement de la personne porteuse (ex. : lit, poignées de porte, table de chevet, toilettes) et en sortant de la chambre.

Se rappeler que, de façon générale, on doit aussi se laver les mains :

- avant de préparer, de manipuler, de servir des aliments ou de manger ;
- après s'être mouché, avoir toussé ou avoir éternué ;
- après une contamination accidentelle avec du sang ou d'autres liquides biologiques ;
- lorsque les mains sont visiblement souillées.

L'utilisation de solution hydro-alcoolique est particulièrement recommandée lors des soins aux porteurs d'ERV mais elle ne dispense pas du lavage de mains lorsque celles-ci sont souillées.

Annexe 2 : Fiche d'alerte InVS du 24 mai 2005

Date du 1^{er} signalement de l'alerte : 16/05/05 – actualisation après conférence DGS du 24/05 17h00

Personne InVS déclenchant l'alerte (Dpt/Unité/CIRE) : Dr B. Coignard, InVS/DMI/NOA

Origine du signal (Institution) : CHU Nancy (54)

S'agit-il d'une pathologie ☒ de l'exposition à un danger ☐

Date de survenue : oct 04 à mai 05

Lieu : CHU Nancy (Hôpital Brabois + Moyen Séjour « Spillman »)

Description : infections et colonisations à *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (vanA) : 53 porteurs au 24/05/05 (4 infections), dans 8 services de l'hôpital Brabois – néphrologie, médecine B gériatrie, réanimation médicale TD6, hépato-gastro-entérologie (HGE), chirurgie cardiaque, urologie, endocrinologie – et un centre de moyen séjour « Spillmann » ; aucun décès imputable.

Les entérocoques, de portage essentiellement digestif chez l'homme, sont responsables d'infections urinaires, de bactériémies ou de suppurations de plaies (6% des micro-organismes isolés d'infections nosocomiales, au 4^{ème} rang après *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* ; données ENP 2001). Les patients les plus à risque sont hospitalisés en hémodialyse, en unité de soins intensifs, hémato-cancérologie, ayant subi une transplantation ou une autre intervention chirurgicale majeure. La transmission des entérocoques se fait par les mains, le matériel et l'environnement, et est facilitée par la diarrhée, l'incontinence fécale et les suppurations. *E. faecium* est moins fréquent et moins pathogène que *E. faecalis*, mais est plus fréquemment résistant aux antibiotiques. En France, la proportion de résistance à la vancomycine chez les entérocoques est stable depuis plusieurs années et estimée <2% (données EARSS 2003).

Alerte le 24/12/04 suite à l'isolement entre le 8/10/04 et le 20/12/04 de 6 souches (1 infection urinaire, 5 colonisations) en néphrologie (n=4), médecine B (n=1) et HGE (n=1). En janvier 2005, détection de 3 infections en réanimation médicale TD6 et 1 colonisation en HGE. Plusieurs dépistages « un jour donné » successifs identifient 5 (19%) patients colonisés en néphrologie en février, 7 (26%) en avril en médecine B, et 9 (20%) en moyen séjour en mai. Entre ces dépistages, 22 colonisés sont identifiés dans les services déjà concernés, ainsi qu'en urologie (n=1), en endocrinologie (n=1) et en chirurgie cardiaque (n=1) ; les 3 derniers porteurs ont été détectés en médecine B. Toutes les souches présentent le même phénotype de résistance et les 10 premières le même profil en électrophorèse en champ pulsé (clonalité).

Si pathologie :

Nature de la pathologie : infections et colonisations à *E. faecium* résistant à la vancomycine (ERV)

Nb de cas	Suspectés	: 53
	Confirmés	: 53 (4 infections + 49 colonisations)
	Hospitalisés	: 14 (au 11/05/05) + 11 en CHG, SSR ou maison de retraite + 13 à domicile
	Décédés	: 15 (<u>aucun décès imputable</u> après revue de mortalité)

Population concernée : patients hospitalisés dans les services affectés, et éventuellement autres services des 2 sites concernés (Hôpital de Brabois et Centre de Moyen Séjour Spillmann).

Investigation(s) en cours : Oui ☒ Non ☐

Si oui, institution(s) responsable(s) : CHU de Nancy, Cellule Régionale d'Hygiène, Drass Lorraine, ARH

Description succincte : Surveillance microbiologique des ERV, dépistage des patients contacts, dépistage à l'admission et hebdomadaire en réanimation, dépistage des patients transférés ou à risque à l'admission en néphrologie, en médecine B et en moyen séjour, dépistage en sortie de tous les patients typage des souches. La réalisation d'une enquête de prévalence dans l'ensemble des services du CHU est prévue la 1^{ère} semaine de juin afin d'identifier les services hébergeant des porteurs.

Mesures de contrôle : les mesures de contrôle ont d'abord consisté en l'application des recommandations habituelles de lutte contre les BMR : **rappel des précautions standard + contact (isolement) pour tout porteur, renforcement de l'hygiène des mains (utilisation de SHA), signalisation BMR de tout porteur et transmission de cette information au sein des équipes médicales du CHU et lors des transferts**. La commission d'antibiothérapie de l'établissement a été saisie pour diffuser des **recommandations de bon usage des antibiotiques (céphalosporines de 3^{ème} génération, glycopeptides)**. Les porteurs identifiés en réanimation médicale sont isolés ; en néphrologie, médecine B, HGE, moyen séjour « Spillmann », l'isolement ou le « cohorting » sont impossibles et les porteurs sont transférés pour isolement dans le service de maladies infectieuses. L'utilisation d'une unité dédiée à l'accueil de ces porteurs, proche du service de maladies infectieuses, est envisagée. Des audits de pratiques externes sont en cours. **Les transferts vers les maisons de retraite ou centres de rééducation sont différés compte tenu des difficultés pour ces structures d'isoler les patients**. Si un transfert est nécessaire, les patients font l'objet d'un dépistage et d'un suivi par la Cellule Régionale d'Hygiène qui aide les établissements receveurs (n° de téléphone d'astreinte) ; 11 porteurs transférés du CHU sont aujourd'hui hébergés dans des établissements de la région : ils n'ont pas été à l'origine de cas secondaires dans les établissements concernés.

Potentiel Evolution : situation épidémique non encore maîtrisée, du fait d'une application hétérogène des recommandations « BMR » dans les services atteints : le dépistage systématique + isolement probabiliste à l'admission et le dépistage hebdomadaire sont en place en réanimation médicale ; en néphrologie, médecine B, HGE, seul un dépistage à l'admission est effectué sans isolement probabiliste. En moyen séjour, seul un dépistage à l'admission est effectué avec isolement probabiliste.

Impact international potentiel : Oui ☐ Non ☒
- Européen :
- Autre :

Commentaires (personnes ou institutions déjà contactées...) :

Le CHU a signalé les 4 premiers cas le 27/12/04, transmis un rapport d'étape en mars et une actualisation de celui-ci en mai. Les données actualisées en conférence le 24/05 montrent que l'épidémie est limitée à 2 sites du CHU de Nancy et que les patients transférés hors CHU n'ont pas été à l'origine de cas secondaires ; pas d'autres épisodes de cas groupés similaires signalés dans d'autres établissements. Les mesures de contrôle au CHU doivent être renforcées pour interrompre la transmission croisée dans les services déjà touchés et éviter une diffusion de la souche dans d'autres services ou sites du CHU.

Une réunion de suivi organisée par la DGS le 24/05 a acté les principaux points suivants :

- renforcement nécessaire des mesures de dépistage (systématique à l'admission et hebdomadaire) et d'isolement géographique dans les 3 services n'ayant pas encore appliqué cette stratégie (néphrologie, HGE, médecine gériatrique) ; application selon moyens du

laboratoire (OK à partir du 7 juin) et capacités en lits à disposition des équipes pour l'isolement (réflexion en cours sur une unité dédiée) ;

- enquête de prévalence début juin dans tous les services du CHU pour identifier les services hébergeant des patients porteurs ; la stratégie d'isolement qui sera appliquée ensuite doit être définie dès maintenant;

- poursuite des audits de pratiques en médecine B et HGE (néphrologie déjà étudiée) ; son calendrier reste dépendant des moyens de l'EOH qui sont à renforcer (pas d'infirmière hygiéniste) ;

- renforcement des procédures de signalisation des patients porteurs : en interne et en externe (le pictogramme « BMR » reste inconstamment utilisé) ; poursuite de l'accompagnement des patients lors de leur transfert hors CHU par la Cellule Régionale d'Hygiène ;

- communication en plusieurs temps :

- information ciblée des principaux établissements accueillant des patients (CHU+ARH) ;

- information étendue aux autres établissements lorsque les résultats de prévalence seront connus ;

- pas de communication proactive vers le public à ce stade (le CHU prépare un CP si nécessaire).

Annexe 3 : Note DGS/DHOS, 11 juillet 2005 : Diffusion de recommandations aux présidents des CLIN relative à une augmentation des signalements d'infection nosocomiale à ERV



MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SOLIDARITÉS

Direction de l'hospitalisation
et de l'organisation des soins

Sous-Direction de la Qualité et du Fonctionnement
des établissements de santé
Bureau qualité et sécurité des soins en
établissements de santé

0 1 0 8 3 4

Paris, le 11 JUIL. 2005

Le directeur de l'hospitalisation et de
l'organisation des soins

à

Mesdames et Messieurs les directeurs
d'établissements de santé (*pour information*)

Mesdames et Messieurs les présidents des
comités de lutte contre les infections
nosocomiales (*pour attribution et distribution*)

Objet : Diffusion de recommandations aux présidents des comités de lutte contre les infections nosocomiales relative à une augmentation du nombre de signalements d'infection nosocomiale à entérocoque résistant à la vancomycine.

PJ : Note de synthèse InVS

Dans le cadre de ses activités au sein du Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN), l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a constaté depuis 2004 une **augmentation du nombre de signalements d'infection nosocomiale à entérocoque résistant à la vancomycine (ERV).**

L'InVS contribue par ailleurs depuis cette date, en lien avec les Centres de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales (CClin), les Ddass et les équipes d'hygiène concernées, au suivi de trois épidémies à ERV d'ampleur inhabituelle dans des centres hospitaliers des régions Auvergne, Lorraine et Ile de France.

Ces événements constituent des signaux d'alerte, bien que les données de surveillance actuelles ne montrent pas d'augmentation de la proportion de résistance chez les entérocoques en France (<2%). Quatre pays européens (Portugal, Italie, Grèce et Irlande) présentent aujourd'hui des proportions de résistance supérieures à 10%, en augmentation récente. Aux Etats-Unis, cette proportion avait augmenté d'un facteur 20 en 4 ans au début des années 1990 et les ERV y sont aujourd'hui endémiques. **La situation française peut donc évoluer rapidement et nécessite une attention particulière.**

L'InVS a organisé le 3 mai 2005 une réunion d'experts afin d'analyser la situation et proposer des recommandations pour la surveillance et l'alerte. Vous en trouverez une synthèse en ligne sur le site de l'InVS :

http://www.invs.sante.fr/display/?doc=presse/2005/le_point_sur/enterocoques_vancomycine_050705/index.html

.../...

Dans le cadre du décret du 26 juillet 2001 et de la circulaire DGS/DHOS du 22 janvier 2004, je vous demande donc d'être particulièrement vigilant devant tout isolement d'ERV chez vos patients et **de signaler tout cas groupés d'infection ou colonisation à ERV au CCLIN et à la DDASS** en joignant à la fiche de signalement l'antibiogramme des souches et un descriptif des mesures de contrôle mises en œuvre. Par ailleurs, afin de suivre l'épidémiologie moléculaire des ERV en France et d'apporter un support (confirmation, typage) aux établissements qui en ont besoin, un échantillon représentatif des souches isolées devra être envoyé au CNR Streptocoques¹, qui en assurera l'expertise en lien étroit avec le CNR Résistance aux Antibiotiques.

Cette émergence reflète une nouvelle fois l'importance du problème posé par la diffusion des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France et du respect par les établissements de santé des recommandations pour la maîtrise de la diffusion des bactéries multi-résistantes².

Je vous demande de vérifier que ces recommandations sont bien accessibles aux professionnels concernés et par ailleurs, de vous assurer du respect des précautions standard, protocoles d'isolement et de nettoyage des surfaces. Les conditions de transfert des patients infectés et la traçabilité des patients porteurs doivent faire l'objet d'une attention particulière. Les services les plus à risque vis à vis de l'ERV sont les services de néphrologie, hémodialyse, transplantation et réanimation chirurgicale.

Je serai particulièrement vigilant sur la mise en œuvre et le respect de ces mesures.

Le Directeur de l'Hospitalisation
Et de l'Organisation des Soins

Joan CASTEX

Copie : CCLIN

¹ Centre National de Référence des Streptocoques, Service de Microbiologie, Hôtel Dieu, Université Paris V, 1 place du Parvis Notre-Dame 75181 Paris cedex 04

² Comité Technique National des Infections Nosocomiales. Maîtrise de la diffusion des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, 1999. En ligne, URL : <http://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/nosoco/bacteries/maitbact.html> ou <http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/BMR/BMR.htm>

Annexe 4 : Fiche d'alerte InVS du 11 octobre 2005

Date du 1^{er} signalement de l'alerte : 16/05/05 – **Mise à jour après conférence Desus du 11/10/05.**

Personne InVS déclenchant l'alerte (Dpt/Unité/CIRE) : Dr B. Coignard, InVS/DMI/NOA

Origine du signal (Institution) : CHU Nancy (54)

S'agit-il d'une pathologie ☒

de l'exposition à un danger ☐

Date de survenue : octobre 04 à septembre 05

Lieu : CHU de Nancy

Contexte : les entérocoques, de portage digestif chez l'homme, sont responsables d'infections urinaires, de bactériémies ou de suppurations de plaies (6% des micro-organismes isolés d'infections nosocomiales, au 4^{ème} rang après E. coli, S. aureus et P. aeruginosa ; données ENP 2001). Les patients les plus à risque sont ceux de néphrologie-hémodialyse, réanimation, hémato-cancérologie, transplantés ou ayant subi une intervention chirurgicale majeure. Leur transmission est manuportée, par le matériel et l'environnement, et facilitée par la diarrhée, l'incontinence fécale et les suppurations. En France, la proportion de résistance à la vancomycine chez les entérocoques était stable et estimée <2% (données EARSS 2003) ; une augmentation récente (6,2%, données EARSS 2004) est constatée et simultanée d'une augmentation du nombre de signalements à ce germe. Cette émergence des infections ou colonisations à entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) a fait l'objet d'une alerte InVS en date du 05/07/05.

Description : épidémie à *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine: 131 porteurs entre le 8/10/04 et le 07/10/05 (+14 porteurs depuis le 26/08) dont 4 infections dans 15 services du CHU. Les cas proviennent de 9 services de l'hôpital Brabois, 2 services de l'Hôpital Central, 1 service de l'hôpital MVF (dermatologie), 1 moyen séjour (centre Spillmann) et 2 longs séjours (St Stanislas et St Julien) ; 112 (85%) ont été identifiés dans 5 services : néphrologie-hémodialyse (N=27, stable), médecine B gériatrique (N=31, +1 porteur depuis le 26/08), moyen séjour (N=17, +2 porteurs), hépato-gastro-entérologie (HGE) (N=24, +5 porteurs) et maladies infectieuses (n=13, +5 porteurs). Ces 4 derniers services sont les seuls à observer de nouveaux cas depuis le 26/08, avec un long séjour (St Julien).

Une enquête de prévalence réalisée du 30/05/05 au 03/06/05 dans tous les services du CHU non explorés, a permis de dépister en 5 jours 1 102 patients (76% de 1 454 présents) et a seulement identifié 9 (0,82%) nouveaux porteurs dans 5 services supplémentaires. Elle a permis de confirmer que les services les plus à risque étaient ceux déjà identifiés (essentiellement à Brabois). Une enquête cas-témoins (83 cas et 83 témoins appariés sur l'âge, le sexe et le service) a identifié les facteurs de risque de portage suivant : consommation de céphalosporine de 3^{ème} génération pendant le séjour, consommation de glycopeptides pendant le séjour, contact avec des kinésithérapeutes/ergothérapeutes, utilisation de savons solides pour le lavage des mains. Les deux premiers sont classiquement retrouvés et faisaient déjà l'objet d'actions via la commission d'antibiothérapie du CHU ; les deux derniers, en faveur d'une transmission croisée, font depuis l'objet d'actions spécifiques (formation des personnels, passage à l'usage de savons liquides).

Les patients porteurs font l'objet d'un suivi systématique. Au 07/10/05, 21 étaient hospitalisés au CHU, 1 en SSR, 13 en maison de retraite ou USLD, 2 en CH périphérique et 56 étaient rentrés à domicile ; 38 sont décédés mais aucun décès n'est imputable à une infection à ERV. Un des patients connus porteurs à Nancy a été hospitalisé en juillet à Bordeaux et à l'origine d'un cas secondaire : le signalement du caractère porteur de ce patient par Nancy a permis de circonscrire rapidement cet épisode.

4 souches représentatives de l'épidémie, isolées entre octobre 2004 et mars 2005 et transmises au CNR, ont des pulsotypes comparables, différents de ceux retrouvés à Clermont-Ferrand ou en Ile-de-France.

Si pathologie :

Nature de la pathologie : infections et colonisations à *E. faecium* résistant à la vancomycine (ERV)

Nb de cas Suspectés : 0
 Confirmés : 131 (4 infections + 127 colonisations)
 Hospitalisés : 21 (au CHU au 07/10/05)
 Décédés : 38 (aucun décès imputable)

Population concernée : patients hospitalisés au CHU de Nancy

Investigation(s) en cours : Oui ☒ Non ☐

Si oui, institution(s) responsable(s) : CHU de Nancy, Cellule Régionale d'Hygiène, Drass Lorraine, ARH

Description succincte : surveillance microbiologique ; dépistage des patients contacts ; dépistage systématique des porteurs, typage des souches (CNR), enquête de prévalence et enquête cas-témoins.

Mesures de contrôle : rappel des précautions standard + précautions contact (isolement) indiquées pour tout patient porteur, renforcement de l'hygiène des mains (utilisation de SHA), signalisation « BMR » des porteurs et information des équipes médicales lors des transferts. Diffusion de recommandations de bon usage des antibiotiques (céphalosporines de 3^{ème} génération, glycopeptides) sous l'égide de la commission d'antibiothérapie. Isolement des patients porteurs dans les services ; si impossible, patients transférés dans le service de maladies infectieuses. Au 07/10/05, dépistage à l'entrée et hebdomadaire en réanimation médicale ; dépistage à l'entrée, hebdomadaire et à la sortie en néphrologie-hémodialyse, médecine B gériatrique, moyen séjour Spillmann, maladies infectieuses et HGE ; dépistage seulement à l'entrée (si facteur de risque ERV) + dépistage à la sortie en LS St Stanislas.

Pour les patients porteurs transférés hors CHU, suivi et conseil aux établissements receveurs par la Cellule Régionale d'Hygiène. Tous les audits de pratiques prévus au CHU ont été réalisés (en néphrologie, urologie, médecine B gériatrique, HGE, MS Spillmann et Maladies infectieuses) ; la formation des personnels y est organisée. Les patients porteurs de VRE sont informés de leur état et une plaquette spécifique leur est remise.

Potentiel Evolution : diminution constante du nombre de nouveaux patients porteurs depuis juin 2005 ; la transmission des ERV est encore active dans 4 services, et le suivi de cet épisode par l'équipe d'hygiène du CHU et la cellule régionale maintenu pour pouvoir confirmer cette tendance.

Impact international potentiel : Oui ☐ Non ☒

- Européen :
- Autre :

Commentaires (personnes ou institutions déjà contactées...) :

Les mesures de contrôle ont été renforcées conformément aux décisions prises en réunion avec la DGS le 24/05 (renforcement du dépistage et des mesures d'isolement, audits de

pratique, enquête de prévalence, signalisation des patients porteurs, information des établissements de la région en lien avec la Drass), et confirmées lors de la réunion de suivi du 11/10/05. *La gestion locorégionale de cet épisode est opérationnelle et le niveau d'alerte national n'est donc plus nécessaire : le 11/10/05, Ddass, Drass et CClin Est sont invités par la DGS à poursuivre le suivi de cet épisode en lien avec l'EOH du CHU de Nancy, et à transmettre à l'InVS un bilan actualisé en début de chaque mois. Pas de nouvelle conférence DGS hors demande Ddass / InVS ou évolution défavorable ; cette fiche alerte est close le 11/10/05.*

Devant l'émergence d'infections ou cas groupés d'infections à VRE dans les établissements de santé en France, une note d'information a été diffusée par la DHOS à tous les hôpitaux en France (via Ddass et ARH) le 13/07/05 pour inciter les établissements à signaler les cas de VRE, leur indiquer les services les plus à risque et rappeler les recommandations de prévention de la diffusion des bactéries multi résistantes. Un avis du CTINILS sur la prévention de la transmission des ERV sera prochainement diffusé.

Annexe 5 : Note DGS/DHOS, Décembre 2006 : Mesures à prendre en cas d'épidémie à ERV



MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SOLIDARITÉS

DIRECTION DE L'HOSPITALISATION ET DE
L'ORGANISATION DES SOINS

Sous-Direction de la Qualité et
du Fonctionnement des établissements de santé
Bureau qualité et sécurité des soins
en établissements de santé

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ
Sous-Direction Pathologies et santé
Bureau Maladies infectieuses et politique vaccinale

00 06 27

Paris, le 06 Dec 2006

LA DIRECTRICE DE L'HOSPITALISATION ET DE
L'ORGANISATION DES SOINS

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL DE LA SANTÉ

à

Mesdames et Messieurs les directeurs des agences
régionales de l'hospitalisation
(pour information)

Mesdames et Messieurs les préfets de région,
Directions régionales des affaires sanitaires et sociales
(pour information)

Mesdames et Messieurs les préfets de département
Directions départementales des affaires sanitaires et
sociales
(pour attribution)

Messieurs les responsables des centres de coordination
de la lutte contre les infections nosocomiales
(pour information)

OBJET : Prévention de l'émergence des épidémies d'entérocoques résistants à la vancomycine dans les établissements de santé.

Dans le cadre de la politique générale de lutte contre les infections nosocomiales et de la politique de maîtrise de l'utilisation des antibiotiques, et du fait d'épidémies hospitalières récentes à entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) d'ampleur inhabituelle, le CTINILS a émis, en octobre 2005, un avis relatif à la maîtrise de la diffusion des ERG dans les établissements de santé. Cet avis, publié au bulletin officiel de la République Française, a été suivi de recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Ces différents travaux, ainsi que la synthèse d'une expertise collective coordonnée par l'InVS, ont fait l'objet d'une publication dans un numéro spécial du Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (2006- n°13 du 28 mars 2006) consacré à ce thème.

Le principal problème que constituent les ERG, bactéries de faible pouvoir pathogène, est représenté par le risque de transférer la résistance aux glycopeptides, en particulier la résistance à la vancomycine, vers les staphylocoques dorés. Le phénomène a été observé aux Etats-Unis parmi plusieurs souches de staphylocoques, notamment résistantes à la méticilline. La France connaissant, comme ses voisins européens, une situation endémique en matière de résistance à la méticilline des staphylocoques dorés, ce transfert de résistance pourrait avoir un impact non négligeable sur la mortalité et la morbidité liées aux infections staphylococciques sévères. C'est pourquoi le contrôle de la diffusion des clones d'ERG constitue un enjeu majeur.

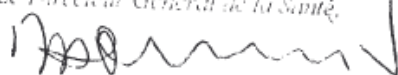
Les mesures nécessaires pour maîtriser la diffusion des ERG ne diffèrent pas dans l'ensemble des mesures de prévention de la diffusion d'autres bactéries multirésistantes à transmission manuportée, mais l'avis du CTINILS avait été émis pour détailler plus spécifiquement les caractéristiques liées à ce micro-organisme. Cependant, en raison notamment d'une proportion beaucoup plus importante de patients colonisés que de patients infectés, l'expérience a montré que le contrôle des épidémies à ERG nécessitait une application précoce, très stricte et rigoureuse des recommandations. Or la mise en application des recommandations émises dans l'avis du CTINILS semble rencontrer en pratique un certain nombre d'obstacles. En particulier :

- l'application des recommandations d'hygiène appropriées (précautions dites « contact ») n'est pas toujours suffisante ;
- la mise en place de mesures d'isolement des patients (pouvant aller jusqu'à la fermeture d'une unité ou l'arrêt des admissions) nécessite une réorganisation temporaire de l'établissement de santé. La mobilisation de l'équipe de direction et des services cliniques et techniques concernés, n'a pas toujours été obtenue de façon satisfaisante ou dans des délais suffisants.

Afin d'aider les professionnels des établissements de santé à faire face à une éventuelle épidémie à ERG, une fiche technique opérationnelle, jointe à cette note d'information, a été établie par le CTINILS à partir de l'avis du 6 octobre 2005. Elle décline les actions à mettre en place en fonction de leur priorité.

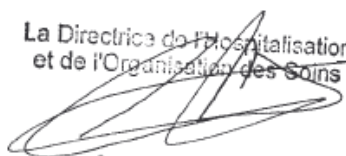
Nous vous prions de bien vouloir transmettre cette note et la fiche technique opérationnelle à tous les directeurs des établissements de santé de votre département, afin qu'ils en assurent la diffusion la plus large possible aux professionnels de leurs établissements.

Le Directeur Général de la Santé



Pr Didier HOUSSIN

*La Directrice de l'Hospitalisation
et de l'Organisation des Soins*



Annie PODEUR

Annexe 6 : Fiche technique opérationnelle : Prévention de l'émergence d'épidémie d'ERV dans les établissements de santé

09/10/2006

page 1/2

Prévention de l'émergence des épidémies d'entérocoques résistants à la vancomycine dans les établissements de santé Fiche technique opérationnelle

Alerte donnée par le laboratoire de bactériologie à l'équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière (EOHH)

Point de départ : identification d'un premier cas (cas index) de *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (ERV) chez un patient hospitalisé dans un établissement de santé qui n'est pas (ou n'est plus) en situation épidémique.

En raison :

(a) de l'importance décisive dans le contrôle des épidémies à ERV de la rapidité de mise en place des mesures de prévention listées ci-dessous et

(b) des difficultés techniques pour différencier les souches qui exposent à un risque d'épidémie (*E. faecium* portant un gène acquis de résistance, essentiellement *vanA*, beaucoup plus rarement *vanB*) de celles qui n'exposent pas a priori à ce risque : espèces naturellement résistantes à la vancomycine (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) ou *E. faecalis* portant un gène acquis de résistance.

- Les laboratoires de bactériologie doivent être à même d'organiser rapidement (de préférence dans les 48 heures) l'identification de l'espèce et la confirmation de la résistance à la vancomycine de toute souche d'entérocoque de comportement suspect vis à vis des glycopeptides (cf. listes des comportements suspects dans le communiqué 2006 du CA-SFM¹, tableau XI).
- Les laboratoires qui ne sont pas à même de procéder eux-mêmes rapidement aux tests nécessaires (par exemple l'identification du gène *vanA* par méthode moléculaire) doivent passer un accord préalable avec un autre laboratoire géographiquement proche et prêt à assurer le travail dans les délais ci-dessus dès la survenue d'une alerte.

Etape 1 : Evaluation de la situation, dès le premier jour.

- Isoler le patient porteur (mise en place, en plus des précautions d'hygiène « standard », de précautions complémentaires « contact » et signalisation « Bactérie multi-résistante »).
- Alerter la Direction de l'établissement. Son appui est indispensable pour l'organisation des mesures à prendre et la prise en compte de leurs conséquences en termes d'activité et d'organisation du travail. Alerter la sous-commission de la CME chargée de la prévention de la résistance aux antibiotiques dans les établissements de santé publics ou la commission des antibiotiques dans les autres établissements de santé (cf. Etape 3 : mesures à appliquer tout au long de l'épidémie).
- Arrêter les transferts du patient porteur (cas index) et de ses contacts (patients hospitalisés dans la même unité depuis l'admission du cas index) vers d'autres unités, services ou établissements afin de limiter la diffusion.

Une unité est définie comme l'ensemble des patients qui partagent (jour et nuit) la même équipe soignante.

Si le patient porteur a déjà été transféré dans une autre unité entre le moment du prélèvement qui a permis le diagnostic et le moment où le cas a été confirmé, cette mesure s'applique à l'unité d'origine et à l'unité d'accueil.

- En attendant l'évaluation de la situation, limiter les admissions dans l'unité aux seules urgences qui ne peuvent être orientées vers d'autres unités, services ou établissements de santé.

¹ CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

- Organiser une enquête de portage fécal « transversale » (prélèvement : écouvillonnage rectal ou selles ; techniques de culture : cf. recommandations spécifiques) parmi les patients contacts.
Si possible, procéder de même dès le 1^{er} jour, autour de chacun des patients contacts déjà transférés au moment de la découverte du cas initial (cf. points suivants dans l'étape 2 ci-après).

Etape 2 : dans les 2 jours suivants :

- Etablir la liste des patients contacts déjà transférés et du lieu de leur transfert.
- Organiser une enquête de portage fécal autour de chacun des patients contacts déjà transférés au moment de la découverte du cas initial.
- Demander au laboratoire de microbiologie d'examiner sa base de données pour identifier d'éventuels cas suspects plus anciens.
- Renforcer l'hygiène des mains, promouvoir l'utilisation des solutions hydroalcooliques (SHA).
- Renforcer le bio-nettoyage quotidien de l'environnement des cas.
- Définir quel devrait être le traitement antibiotique le plus adapté au profil de résistance de la souche impliquée, en cas de survenue d'infection.
- Signaler au CCLIN et à la DDASS tout cas identifié d'infection ou de colonisation.

Etape 3 : Mesures à appliquer tout au long de l'épidémie, en plus des précautions « standard » et « contact »

- Regrouper les cas (patients connus porteurs) au fur et à mesure de leur détection dans un secteur géographique unique de l'hôpital et leur affecter un personnel particulier dit « dédié » (« **secteur des porteurs** »).
- Regrouper les patients contacts des cas et leur affecter un personnel « dédié » différent du précédent (« **secteur des contacts** »).
- Favoriser les sorties à domicile des patients porteurs et des patients contacts non connus porteurs.
- La reprise des admissions peut se faire dans un 3^{ème} secteur (« **secteur indemne** »), distinct des 2 autres secteurs et ne partageant pas le même personnel avec ceux-ci.
- Organiser le dépistage transversal hebdomadaire des patients contacts.
- Après 3 prélèvements hebdomadaires négatifs, les patients contacts non connus porteurs peuvent être transférés mais isolés dans leur service d'accueil et leur dépistage est poursuivi tout au long de leur hospitalisation. Veiller à limiter ces transferts aux seuls patients dont l'état clinique le justifie.
En cas d'hospitalisation très prolongée (en unités de soins de longue durée, USLD), et dès lors que la situation épidémique semble maîtrisée, les patients contacts peuvent faire l'objet d'un dépistage plus espacé mais régulier (par exemple : tous les 15 jours ou tous les mois). Dans ce cas, il faut veiller à renouveler le dépistage dès que les patients contacts sont soumis à un traitement antibiotique.
- Limiter l'utilisation des antibiotiques afin de diminuer la pression de sélection, facteur de risque majeur d'émergence des ERV.
- Rechercher un portage de SARM (nez, plaies chroniques) chez les patients porteurs d'ERV. La décontamination des patients porteurs d'ERV et de SARM par mupirocine nasale et chlorhexidine cutanée doit être envisagée.
- Informer les patients et leur médecin traitant de leur statut de porteur d'ERV.
- Etablir et tenir à jour la liste des patients porteurs et des patients contacts non connus porteurs, transférés ou sortis à domicile, de façon à les mettre en isolement « Bactérie Multi-Résistante » (cf. premier point de l'étape 1) et à les dépister en cas de réadmission.
- Envoyer les souches au Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques (laboratoire associé) en le prévenant au préalable de l'envoi (Pr. R. Leclercq, service de microbiologie, CHU de Caen, tél : 02 31 06 45 72).

Annexe 7 : Fiche de traçabilité à la sortie du patient, Février 2007

ADRESSER PAR FAX
A LA CELLULE REGIONALE D'HYGIENE
03 83 15 39 73

**SORTIE DU PATIENT
TRACABILITE**

Date : /_/ /_/ /_/ /_/ /_/

Nom du patient :

Age :

Lieu de transfert :

Coordonnée de l'établissement d'accueil :
.....

Tél. : /_/ /_/ /_/ /_/ /_/ /_/ /_/

Joindre la photocopie de la feuille de liaison

Coordonnée de la personne contactée dans l'établissement d'accueil :
.....

Est-ce que le patient a été transféré avec pictogramme sur le dossier ☐

Plaquettes précautions entériques ☐

Livret ambulancier ☐

Livret hygiène à domicile ☐

Nom de la société d'ambulance :

.../...

SI TRANSFERT A DOMICILE

COORDONNEES

➤ **Médecin traitant :**

NOM :

Adresse :

[illegible]

➤ **Infirmière :**

NOM :

Adresse :

[illegible]

➤ **Kinésithérapeute :**

NOM :

Adresse :

[illegible]

➤ **Aide ménagère :**

NOM :

Adresse :

[illegible]

➤ **Structure de dialyse :**

NOM :

Adresse :

[illegible]

Annexe 8 : Recommandations concernant le transfert des patients

Eviter les transferts le vendredi après-midi (difficulté de joindre les différents intervenants, diminution du nombre de soignants le week-end ...) et délai suffisant pour l'organisation dans le service (problème de médicaments), etc....

DES QUE LA SORTIE DU PATIENT EST POSSIBLE

Le cadre du service prévient :

L'ETABLISSEMENT D'ACCUEIL	SI DOMICILE	CELLULE REGIONALE HYGIENE
➤ Malade nécessitant des précautions contact de type entériques	➤ Vérifier si présence d'autres membres de la famille à risques cancer, immunodépression, enfants en bas âge	Fax : 53973
➤ Etat du patient, niveau de dépendance	➤ Information des mesures à prendre + + + +	Nom du patient
➤ Charge en soins (Toilette complète, etc...)	➤ Y- a-t-il des soins prévus <input type="checkbox"/> nursing <input type="checkbox"/>	Date prévue de sortie <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> ↙ ↘ </div>
➤ Prévention d'escarres, etc...	➤ Coordonnées des soignants :	Etablissement Domicile

POUR TOUT TRANSFERT

ETABLISSEMENT	DOMICILE
Le service doit fournir :	
1. Feuille de liaison + pictogramme Pictogramme sur le dossier ou l'enveloppe	IDEM IDEM
2. Plaquettes précautions ENTERIQUES	IDEM
3. Livret ambulancier	IDEM + Information du patient et de sa famille sur l'application des règles d'hygiène de base + Livret hygiène à domicile

Annexe 9 : Fiche de liaison destinée au médecin, à l'infirmière,
au patient et/ou à sa famille

FICHE LIAISON DESTINEE AU MEDECIN, A L'INFIRMIERE, AU PATIENT ET (OU) SA FAMILLE

Votre patient, M, Mme
a été hospitalisé (e) pour
et, au cours de son séjour, on a découvert la présence d'un entérocoque
résistant à un antibiotique (Vancomycine) dans les selles.

Il est important de prendre quelques précautions pour éviter la diffusion
de ce germe à d'autres personnes (famille, collectivité, soignants, etc...).

La contamination se faisant par l'intermédiaire des matières fécales, il est
important :

- de maintenir une hygiène corporelle quotidienne en utilisant un
savon liquide et des affaires de toilette personnelles (gants,
serviettes, etc...)
- de se laver les mains avec un savon liquide uniquement et le plus
souvent possible, surtout après être allé aux toilettes et avant les
repas.
- de désinfecter les sanitaires avec une solution d'eau de Javel

**Dans le cas d'un transfert vers une collectivité, prévenir
l'établissement et faire suivre cette feuille de liaison afin
que les mêmes mesures soient prises, associées à des
précautions entériques.**

L'Infirmière

Le médecin du service

N° d'identification :

TITRE

**Des ERG et des Hommes...
Et le Bactériologiste dans tout ça ?**

Thèse soutenue le 17 juin 2008

Par Marion GRARE

RESUME :

La résistance aux antibactériens a officiellement commencé le jour de la première administration d'une molécule antibiotique, et restera probablement un compagnon de route pour une durée indéterminée (tant que les Hommes et les bactéries « cohabiteront » ?). L'année 2008 marque les 20 ans de la publication du 1^{er} rapport d'isolats cliniques d'ERV (Entérocoques Résistants à la Vancomycine). Depuis ces 1^{ers} cas, les ERV ou ERG (Entérocoques Résistants aux Glycopeptides) ont émergé comme d'importants pathogènes nosocomiaux, stimulant une intense recherche pour élucider à la fois l'épidémiologie, les mécanismes de la résistance et les facteurs de risque responsables de l'apparition et de la dissémination de ces pathogènes, généralement considérés comme peu virulents.

L'objet de ce mémoire est d'appréhender une épidémie à ERG du point de vue du bactériologiste. Le développement de méthodes sensibles et spécifiques pour le dépistage des colonisations ou infections à ERG, chez un nombre important de patients, simple et facile à mettre en oeuvre, est indispensable au contrôle de la dissémination de ces pathogènes hautement résistants aux antibiotiques. Les méthodes de PCR temps réel ont fait l'objet d'un développement important ces dernières années, en particulier pour le dépistage de BMR telles que les ERG, mais ces techniques sont souvent beaucoup trop coûteuses et complexes pour être mises en oeuvre lors d'une épidémie. Ces techniques n'étaient pas implantées dans notre laboratoire au moment de la résurgence de l'épidémie, et demandaient trop de matériel et de mises au point, pour être installées en urgence. Devant les progrès récents en terme de substrats chromogéniques spécifiques, possédant une sensibilité suffisante pour détecter les ERG au sein d'une flore intestinale polymorphe et abondante, nous avons opté pour cette option, tout en gardant la PCR multiplex comme technique de confirmation. Le milieu chromID VRE (bioMérieux) nous a particulièrement séduit, puisque l'incorporation de deux substrats chromogènes, cibles de deux enzymes spécifiques de *E. faecalis* (α -glucosidase) et de *E. faecium* (β -galactosidase), permet une identification présomptive de ces deux espèces. Au travers des différentes études menées au sein de notre laboratoire, nous avons montré que ce milieu nous permet d'allier sensibilité (avec une lecture après 48 h d'incubation), spécificité (à l'aide de la coloration de Gram, permettant d'éliminer la grande majorité des faux positifs), facilité d'utilisation et de lecture. En association cette méthode classique de culture à la Biologie Moléculaire (PCR multiplex permettant identification et recherche des gènes de résistance, en confirmation), nous avons mis en place un schéma permettant un dépistage efficace des patients porteurs d'ERG, dans les meilleurs délais.

MOTS CLES : Entérocoques Résistants aux Glycopeptides (ERG), colonisation/infection, épidémie, enquête épidémiologique, milieu chromogène sélectif, sensibilité, spécificité, PCR

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr. Alain LOZNIEWSKI PU-PH	Laboratoire de Bactériologie Hôpital Central CHU NANCY	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

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