

UNIVERSITE DE NANTES
UFR DE MEDECINE ET TECHNIQUES MEDICALES

Année 2006

Rôle de l'antibiothérapie et des facteurs liés à l'hôte et à l'hospitalisation sur le risque de colonisation et d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie Biologique
Discipline : Biologie Médecine Santé
Spécialité : Epidémiologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Didier LEPELLETIER

Le 23 juin 2006, devant le jury ci-dessous :

Président **Mr G POTEL**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes

Rapporteurs **Mr JC LUCET**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Paris
 Mr P BERTHELOT, Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier, St Etienne

Examineurs **Mr G POTEL**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes
 Mme N CAROFF, Maître de Conférence des Universités, Nantes

Directeur **Mr H RICHET**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes

Co-Directeur **Mme BM IMBERT**, Professeur des Universités- Praticien hospitalier, Nantes

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES FIGURES.....	6
INTRODUCTION.....	10
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
I. Relation entre antibiothérapie et résistance bactérienne.....	16
A. Introduction.....	
B. Rappels de quelques éléments essentiels de la résistance bactérienne..	17
1. Introduction.....	
2. Les différents mécanismes de résistance.....	
C. Définition du potentiel d'évolution vers la résistance.....	19
1. Introduction.....	
2. La sélection de la résistance.....	20
3. La diffusion de la résistance.....	22
4. Méthodes d'analyse des risques de résistance.....	
4.1. Les méthodes bactériologiques.....	23
4.2. Les méthodes écologiques.....	24
4.3. Les méthodes pharmaco-épidémiologiques.....	25
4.4. Les modèles mathématiques	28
4.5. Les surveillances épidémiologiques	32
4.6. Les méthodes expérimentales	34
D. Exposition des populations aux antibiotiques	35
E. La relation entre usage des antibiotiques et portage d'une bactérie	
résistante.....	38
1. Les bactéries communautaires.....	
2. Les bactéries en milieu hospitalier.....	39

II. Relation entre antibiothérapie et flore intestinale.....	41
A. Impact de l'usage des antibiotiques sur la colonisation digestive chez l'homme.....	41
1. Introduction.....	
2. Elimination des bactéries sensibles.....	42
3. Destruction des barrières anaérobies.....	44
4. Sélection d'entérobactéries résistantes.....	45
5. Acquisition de résistances chez l'individu.....	48
6. Effets expérimentaux des faibles doses.....	49
7. Effets de la durée du traitement.....	50
B. Impact de l'usage des antibiotiques en clinique vétérinaire sur la colonisation digestive chez l'homme.....	51
III. De la colonisation à l'infection chez l'homme: le cas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	53
A. Introduction.....	
B. Etude des réservoirs et colonisation de la flore digestive chez l'homme.	54
1. Les réservoirs naturels.....	
2. La colonisation de la flore intestinale chez l'homme.....	
C. Relation entre colonisation et infection à <i>P. aeruginosa</i>.....	56
1. Introduction.....	
2. Rôle de l'environnement hydrique et transmission épidémique de souches de colonisation ou d'infection.....	57
3. Facteurs de risque d'acquisition de souches résistantes.....	59
RECHERCHE EPIDEMIOLOGIQUE.....	64
Nature et objectifs des recherches.....	65
A. Etude des facteurs de risque d'infections causées par <i>Escherichia coli</i> résistant aux antibiotiques.....	67
1. Introduction.....	

2. Présentation de l' article 1	68
3. Commentaires.....	74
 B. Etude bactériologique et épidémiologique de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération chez <i>Escherichia coli</i>	77
1. Introduction.....	
2. Présentation de l' article 2	78
3. Commentaires.....	89
 C. Etude des facteurs de risque de colonisation gastro-intestinale par des bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques	91
1. Présentation générale de l'étude.....	
2. Matériels et méthodes.....	92
2.1. Etude clinique.....	
2.2. Etude bactériologique.....	
2.3. Analyse statistique.....	95
3. Résultats principaux.....	97
4. Présentation des travaux de recherche et commentaires.....	104
4.1 Etude des facteurs de risque de colonisation de la flore gastro-intestinale par des entérobactéries résistantes aux céphalosoprintes de 3 ^{ème} génération et aux fluoroquinolones (article 3).....	
4.2 Etude du rôle de l'hospitalisation et de l'antibiothérapie sur la colonisation gastro-intestinale par <i>P. aeruginosa</i> (article 4).....	117
4.3 Etude de la relation colonisation digestive-infection par <i>P. aeruginosa</i> ..	134
 DISCUSSION GENERALE	138
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	150
 BIBLIOGRAPHIE	154
 ANNEXES	174

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Pourcentages médian de la résistance à la méticilline chez <i>Staphylococcus aureus</i> dans un échantillon de 38 hôpitaux français (d'après Lepelletier <i>et al.</i> 2001).....	16
Tableau II.	Résistance aux antibiotiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez des patients de réanimation ayant reçu ou non une antibiothérapie (d'après Damas 2006).....	21
Tableau III.	Site de colonisation par des clones de <i>P. aeruginosa</i> identifiés en biologie moléculaire par PFGE (d'après Bertrand <i>et al.</i> 2003).....	38
Tableau IV.	Impact de 10 jours d'antibiothérapie par céphalosporines sur le poids et le nombre total de bactérie par gramme de fèces au niveau du caecum, en fonction de la dose administrée (d'après Van Ogtrop <i>et al.</i> 1991).....	44
Tableau V.	Impact de l'hospitalisation sur la colonisation de la flore intestinale par des bacilles à Gram négatif résistant (d'après Leistevo <i>et al.</i> 1996).....	46
Tableau VI.	Impact des pénicillines orales sur la flore intestinale (d'après Edlund <i>et al.</i> 2000).....	47
Tableau VII.	Impact des céphalosporines orales sur la flore intestinale (d'après Edlund <i>et al.</i> 2000).....	47
Tableau VIII.	Impact des fluoroquinolones orales sur la flore intestinale (d'après Edlund <i>et al.</i> 2000).....	48
Tableau IX.	Colonisation gastro-intestinale par des bacilles à Gram négatif aérobies pendant et après l'hospitalisation (d'après Filius <i>et al.</i> , 2005).....	56
Tableau X.	Caractéristiques des 5 services du CHU de Nantes.....	92
Tableau XI.	Caractéristiques des 933 patients inclus dans 5 services différents du CHU de Nantes entre avril 2000 et mars 2002.....	97
Tableau XII.	Mode d'administration des principaux antibiotiques prescrits dans le mois précédant l'hospitalisation de 933 patients inclus dans 5 services différents du CHU de Nantes de 2000 à 2002.....	101
Tableau XIII.	Facteurs de risque associés à la colonisation digestive par <i>P. aeruginosa</i> pour les patients détectés négatifs à l'admission par analyse multivariée par modèle de Cox.....	126
Tableau XIV.	Différents phénotypes de résistance observés parmi 195 souches de <i>P. Aeruginosa</i> isolé de la flore intestinale de 933 patients hospitalisés dans 5 services du CHU de Nantes de 2000 à 2002.....	127
Tableau XV.	Phénotypes de résistance de 70 souches de <i>P. aeruginosa</i> isolés de la flore intestinale de 82 patients hospitalisés en réanimation.....	128

Tableau XVI. Facteurs de risque de colonisation digestive par une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistante à l'imipénème (analyse univariée)..	132
Tableau XVII. Facteurs de risque de colonisation digestive par une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistante à l'imipénème en analyse multivariée par rapport à des patients colonisés par une souche sensible à l'imipénème ^a et des patients non colonisés par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b	132
Tableau XVIII. Facteurs de risque associés aux infections causées par <i>P. aeruginosa</i> chez 933 patients hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes entre 2000 et 2002 (analyse univariée).....	135
Tableau XIX. Facteurs de risque associés aux infections à <i>P. aeruginosa</i> chez 933 patients hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes entre 2000 et 2002 (analyse mutivariée par régression logistique binaire, méthode descendante conditionnelle, SPSS®).....	136

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Variation géographique de la prévalence de la résistance à la méticilline chez <i>Staphylococcus aureus</i> en Europe (1999-2002) (d'après Tiemersma <i>et al.</i> 2004).....	16
Figure 2. Les trois composants des pompes à efflux chez <i>P. aeruginosa</i> . (d'après Livermore 2002).....	19
Figure 3. Evolution pharmacodynamique de l'émergence d'un mutant. Probabilité pharmacocinétique selon des CMI et CPM arbitraires (d'après Drlica 2003).....	24
Figure 4. A, Sensibilité des entérobactéries aux céphalosporines de 3 ^e génération (ligne continue) et exposition en dose définie journalière (DDD, ligne en pointillé). B, Sensibilité des entérobactéries aux fluoroquinolones et exposition en DDD. C, Sensibilité des entérobactéries à l'association amoxicilline-sulbactam et exposition en DDD. D, Sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> à l'imipénème et exposition en DDD (d'après Harbarth <i>et al.</i> 2001).....	26
Figure 5. Consommation mensuelle de ceftazidime en DDD pour 1000 journées-patient (ligne en noir) et pourcentage de souches de bacilles à Gram négatif résistantes ou intermédiaires à la ceftazidime (ligne en clair) à l'hôpital Vega Baja, Espagne, 1991-1998 (d'après Lòpez-Lozano <i>et al.</i> 2000).....	26
Figure 6. Consommation annuelle de ceftazidime en DDD pour 1000 journées-patient (histogramme noir) et pourcentage de souches de bacilles à Gram négatif résistantes ou intermédiaires à la ceftazidime (histogramme blanc) à l'hôpital Vega Baja, Espagne, 1991-1998 (d'après Monnet <i>et al.</i> 2001).....	27
Figure 7. Utilité du croisement des données de la résistance bactérienne et de la consommation des antibiotiques (d'après Monnet <i>et al.</i> 1998).....	28
Figure 8. Consommation mensuelle (observée) de ceftazidime en DDD pour 1000 journées-patient (ligne noir) et pourcentage observé, (ligne grise) et prédit par modélisation (ligne en pointillé) de souches de bacilles à Gram négatif résistantes ou intermédiaires à la ceftazidime à l'hôpital Vega Baja, Espagne, 1991-1998 (d'après Lòpez-Lozano <i>et al.</i> 2001).....	29
Figure 9. Probabilité cumulée de résistance bactérienne à 75 jours aux (A) fluoroquinolones, (B) aux céphalosporines de 3 ^{ème} génération, (C) à l'association ampicilline-sulbactam et (D) à l'imipénème rapportée à l'exposition à ces mêmes antibiotiques. Données de Utah Medical Center, 1994-1998 (d'après Harbarth <i>et al.</i> 2001).....	30
Figure 10. A, Analyse de la résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux fluoroquinolones, stratifiée par année. Coefficient de régression linéaire ($R^2=0,1$ ($y=16+0,0035xDDD$)). B, Analyse de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3 ^e génération, stratifiée par services. $R^2=0,66$ ($y=0,2+0,17xDDD$). C, Analyse de la résistance des entérobactéries à l'association ampicilline-sulbactam, stratifiée par services. $R^2=1,0$ ($y=26+0,16xDDD$) (d'après Harbarth <i>et al.</i> 2001).....	31

Figure 11. Différents niveaux de l'impact de l'antibiothérapie sur la pression de sélection aux antibiotiques (d'après Guillemot 2001).....	35
Figure 12. Colonisation par différents génotypes de <i>P. aeruginosa</i> en réanimation (d'après Bergmans <i>et al.</i> 1998).....	37
Figure 13. Evolution et contrôle de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif (Unité de soins intensifs, Hôpital de New York, Quens) (d'après Rahal <i>et al.</i> 2002).....	39
Figure 14. Effet du traitement parentéral de quatre céphalosporines pendant 9 jours sur le nombre de bactéries à Gram négatif (AGNR) dans la flore intestinale de la souris (d'après Van Ogtrop <i>et al.</i> 1991).....	43
Figure 15. Influence du traitement antibiotique <i>per os</i> (Bacitracine-Streptomycine-néomycine) sur le nombre de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les fèces de souris nues en isolateur (d'après Tancrede 1977).....	45
Figure 16. Comparaison séquentielle de la flore fécale dans un groupe de souris gnotobiotiques recevant de faibles doses d'antibiotiques par voie orale (EXP) et dans un groupe témoin (TEM) (d'après Corpet <i>et al.</i> 1987).....	49
Figure 17. Courbes de Kaplan-Meier analysant la probabilité de rester non colonisé par des entérobactéries résistantes au céfotaxime dans deux groupes de patients, l'un exposé au céfotaxime (n=68) (—), l'autre non exposé au céfotaxime (n=31) (– –) dans un service d'Onco-Hématologie (d'après Prevot <i>et al.</i> 1986).....	50
Figure 18. Complexité des interrelations entre les quatre écosystèmes (Animal/Homme/Sol/Eau) (d'après Faye 2005).....	52
Figure 19. Résistance aux antibiotiques de <i>E. coli</i> à divers antibiotiques testés en fonction de l'origine de l'infection (AMX: amoxicilline, AMC: amoxicilline-acide clavulanique, C1G: céphalosporines de 1 ^{ère} génération, QG: quinolones de 1 ^{ère} génération, C2G: fluoroquinolones, FT: nitrofurane, SXT: cotrimoxazole).....	75
...	
Figure 20. Evolution de la résistance aux fluoroquinolones de souches de <i>E. coli</i> communautaires et hospitalières, 1989-2000 (d'après Lautenbach <i>et al.</i> , 2004).....	75
Figure 21. Proportion (%) de patients chirurgicaux ayant été exposés à une antibioprophylaxie et répartition (%) des antibiotiques et doses reçus.....	99
Figure 22. Proportion (%) de patients ayant été exposés à une antibiothérapie dans le mois précédant leur hospitalisation et répartition (%) des antibiotiques prescrits	100
Figure 23. Proportion (%) de patients ayant été exposés à une antibiothérapie pendant leur hospitalisation et répartition (%) des molécules.....	101
Figure 24. Cinétique de colonisation des patients en fonction de la durée d'hospitalisation.....	103

Figure 25. Répartition (%) des 585 entérobactéries résistantes à l'amoxicilline isolées de prélèvements digestifs chez 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes.....	112
Figure 26. Taux de résistance à la ceftazidime des entérobactéries isolées dans la flore intestinale de 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes et répartition (%) de l'exposition aux β -lactamines.....	114
Figure 27. Croisement de la proportion (%) de patients exposés à l'amoxicilline-acide clavulanique et de la résistance à la ceftazidime chez 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes.....	114
Figure 28. Taux de résistance à l'ofloxacine chez des entérobactéries isolées dans la flore intestinale de 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes et répartition (%) de l'exposition aux fluoroquinolones.....	115
Figure 29. Croisement de la proportion (%) de patients exposés aux fluoroquinolones et de la résistance à l'ofloxacine chez 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes.....	116
Figure 30 Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par <i>P. aeruginosa</i> chez les patients hospitalisés ou non en réanimation chirurgicale (REAC).....	123
Figure 31. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par <i>P. aeruginosa</i> chez les patients hospitalisés ou non en réanimation médicale (REAM).....	123
Figure 32. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par <i>P. aeruginosa</i> chez les patients exposés ou non à une antibiothérapie pendant leur hospitalisation (ATBH).....	124
Figure 33. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par <i>P. aeruginosa</i> chez les patients exposés ou non à l'amoxicilline-acide clavulanique pendant leur hospitalisation (AUG).....	124
Figure 34. Résistance aux antibiotiques de souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées la flore intestinale chez 933 patients hospitalisés dans 5 services du CHU de Nantes.....	126
Figure 35. Analyse génotypique par électrophorèse en champ pulsé de souches polyagglutinables et de sérotype O6 de <i>P. aeruginosa</i> isolé de la flore digestive de patients hospitalisés en réanimation.....	129
Figure 36. Chronologie des isollements de souches de <i>P. aeruginosa</i> en cours d'hospitalisation et exposition à l'imipénème.....	131
Figure 37. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par une souche de <i>P. aeruginosa</i> résistant à l'imipénème chez les patients exposés ou non à l'imipénème (TIENAM4) pendant leur hospitalisation.....	133

Figure 38. Pourcentage de résistance aux antibiotiques de <i>P. aeruginosa</i> isolé chez des patients hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes entre 2000 et 2002.....	134
Figure 39. Analyse génotypique par électrophorèse en champ pulsé de souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées de la flore digestive et de prélèvements cliniques des patients hospitalisés.....	137

INTRODUCTION

L'émergence de la résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique au niveau international, particulièrement en ce qui concerne les infections acquises à l'hôpital (Lorian, 1995, Hakey, 1998, McGowan *et al.*, 1998). L'isolement, dans les hôpitaux du monde entier, d'un grand nombre de bactéries pathogènes résistantes, éventuellement à tous les antibiotiques existants, tels que *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et entérocoques résistants aux glycopeptides (Muto *et al.*, 2003), bacilles à Gram négatif multirésistants comme *Acinetobacter baumannii* (Fournier *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Paramythiotou *et al.*, 2004), et certaines entérobactéries (Rice, 2001) représentent un phénomène préoccupant.

L'émergence de ces bactéries en milieu hospitalier résulte très probablement de l'association combinée de plusieurs facteurs comme la concentration élevée de malades à haut risque infectieux bénéficiant de procédures invasives ou de traitements immunosuppresseurs, la présence de nombreux patients colonisés ou infectés, source de dissémination des bactéries résistantes et l'utilisation très fréquente et parfois inadaptée d'antibiotiques (choix des molécules, doses prescrites, durée de traitement).

Bien que l'on puisse logiquement évoquer l'existence d'une association entre l'utilisation d'antibiotiques et l'émergence de bactéries multirésistantes, peu d'études ont montré un lien direct entre ces deux phénomènes et il s'agit essentiellement d'arguments indirects (Monnet *et al.*, 1998, 2004, Guillemot, 2001).

Ainsi, il a été montré 1) qu'il existe un parallélisme entre la consommation d'antibiotiques et la fréquence d'infections causées par des bactéries résistantes; 2) que la fréquence des résistances est plus grande chez les souches isolées d'infections nosocomiales que chez les souches responsables d'infections communautaires; 3) que, lors d'épidémies d'infections causées par des bactéries résistantes, les patients infectés ont reçu habituellement plus d'antibiotiques que les témoins; 4) qu'il existe une relation entre la durée d'administration d'antibiotique et le risque de colonisation par des bactéries résistantes; 5) que les services qui consomment le plus d'antibiotiques ont la plus forte prévalence d'isolement de bactéries résistantes (Damas *et al.*, 2006).

Ces arguments indirects sont cependant étayés par le fait que la pression de sélection n'est pas dictée par le spectre d'activité de l'antibiotique, mais par le potentiel de résistance présents chez la bactérie et que plus le potentiel de résistance est élevé plus le nombre d'antibiotiques susceptibles de sélectionner des souches multirésistantes est grand.

Ces résultats ont conduit les autorités de santé publique et/ou les sociétés scientifiques à élaborer des recommandations prônant une réduction de l'utilisation d'antibiotiques, ainsi que leur emploi plus judicieux, pour diminuer l'incidence des infections causées par des bactéries résistantes ou pour restaurer l'efficacité des antibiotiques (ANDEM, 1996, Shlaes *et al.*, 1997, Circulaire **n°2002-272 du 2 mai 2002** relative au bon usage des antibiotiques dans les établissements de santé). S'il s'avère que l'administration d'antibiotiques favorise le risque de sélection de bactéries résistantes, de nombreuses inconnues persistent cependant quant à l'efficacité du contrôle de leur utilisation (Jarvis, 1996, Huovinen *et al.*, 1998). En effet, l'impact des antibiothérapies sur les flores commensales et sur la survenue d'infections n'a jamais été systématiquement évalué au sein de cohortes de patients présentant des caractéristiques différentes en terme de risque infectieux ou de risque de colonisation par des bactéries résistantes (Guillemot, 2001, Andremont *et al.*, 2001, Sullivan *et al.*, 2001).

Par ailleurs, des facteurs autres que l'administration d'antibiotiques, susceptibles d'influencer le résultat de l'équation "utilisation d'antibiotique/résistance aux antibiotiques", ont été peu étudiés alors qu'ils jouent probablement un rôle important. La liste de ces facteurs inclut les antécédents d'hospitalisation et de chirurgie, le transfert depuis un autre établissement ou service, la durée et le type de service d'hospitalisation, les antécédents de maladies respiratoires chroniques, diabète, dialyse chronique, immunodépression, la présence de procédures invasives comme l'intubation et les cathéters veineux centraux.

Ceci conduit à envisager que le risque de sélection de bactéries multirésistantes par les antibiotiques et de leur dissémination puisse varier considérablement et qu'il devient nécessaire d'identifier les populations de patients chez lesquelles ce risque est le plus grand et impose une meilleure maîtrise des prescriptions d'antibiotiques.

Dans le cadre de nos activités hospitalières, nous sommes régulièrement confrontés à des observations de ce type, qui incitent à s'interroger sur l'impact, à plus ou moins long terme, des antibiothérapies sur l'épidémiologie de la résistance bactérienne, notamment lors de la prise en charge d'infections causées par des entérobactéries ou *Pseudomonas aeruginosa*, fréquemment responsables d'infections nosocomiales.

Nos objectifs étaient d'étudier, de façon approfondie, les différents liens de causalité, d'intérêt pratique, entre la consommation d'antibiotiques et la résistance bactérienne. Nous souhaitions d'une part identifier les facteurs de risque d'infections causées par des germes résistants aux antibiotiques, en prenant comme modèle bactérien *Escherichia coli*, et d'autre part évaluer l'impact de l'antibiothérapie sur la colonisation digestive par des bactéries résistantes, en particulier les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, dans différents groupes de patients hospitalisés. Cette deuxième partie s'inscrivait dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique national.

Dans un premier temps, nous présenterons un rappel des connaissances actuelles sur l'épidémiologie de la résistance bactérienne et l'exposition des populations aux antibiotiques. Les travaux que nous avons publiés seront ensuite successivement présentés et commentés. Enfin, nous aborderons une discussion générale sur l'intérêt des données rapportées et les perspectives qu'elles peuvent ouvrir.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Bases des connaissances actuelles

I. Relation entre antibiothérapie et résistance bactérienne

A. Introduction

L'évolution des résistances bactériennes constitue aujourd'hui un problème majeur de santé publique, comparable à ceux posés par toute iatrogénie médicamenteuse. Il s'y ajoute une dimension collective compte tenu des phénomènes de transmission interindividuelle des souches bactériennes résistantes (Guillemot, 2001). A ce titre, l'évolution de la résistance chez *Staphylococcus aureus* est un exemple remarquable.

Dès 1946, 14% de souches de *Staphylococcus aureus* étaient résistantes à la pénicilline, soit à peine 5 ans après sa mise sur le marché (Beigelman *et al.*, 1950, Mayr-Harting, 1955). La production par ces bactéries de pénicillinase va croître de façon spectaculaire et les taux de résistance ont atteint 58% en 1948 et 80% en 1959 (Ridley, 1970).

L'introduction de la méticilline en 1959 pour le traitement des infections à *Staphylococcus aureus* devenus résistants à la pénicilline et à la streptomycine a soulevé un immense espoir. Mais à peine un an plus tard, les premières souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont apparues dans un hôpital de Grande-Bretagne (Jevons, 1961). Sur 5440 souches étudiées par P. Jevons, 3 étaient résistantes : la première avait été isolée chez un patient traité par la pénicilline pour un eczéma, la seconde d'une infection cutanée au doigt de son infirmière et la troisième, d'une plaie post-opératoire chez un autre malade suivi par la même infirmière. La première épidémie à SARM venait d'être décrite sous ses différents aspects avec l'isolement d'une souche sélectionnée par une β -lactamine et transmissible à un autre malade en milieu hospitalier par l'intermédiaire des mains du personnel soignant.

Les SARM ont rapidement été considérés comme des bactéries multirésistantes car à la résistance à la méticilline, était associée la résistance à la streptomycine, à la

tétracycline et aux sulfamides auxquelles est venue s'ajouter au fil des années, la résistance aux macrolides, au chloramphénicol, aux aminosides et aux fluoroquinolones (**Tableau I**, Lepelletier *et al.*, 2001 et 2004, **Figure 1**, Tiemersma *et al.*, 2004 et 2005). Dans ce contexte, l'émergence et la diffusion de souches de SARM intermédiaires ou résistantes aux glycopeptides est une situation préoccupante (Appelbaum PC, 2006).

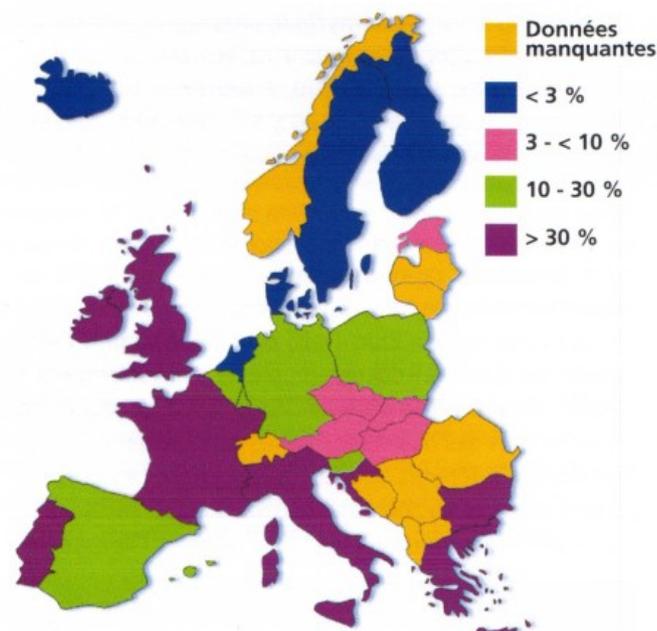


Figure 1. Variation géographique de la prévalence de la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* en Europe (1999-2002) (d'après Tiemersma *et al.* 2004)

Tableau I. Pourcentages médians de la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* dans un échantillon de 38 hôpitaux français (d'après Lepelletier *et al.* 2001)

	Antibiotiques testés					
	GM	FA	FOS	RA	PT	SXT
Année						
1990	18 (6-34.4)	1.8 (0-3.6)	8 (2-30)	11 (4-27)	1.2 (0-4)	1.2 (0-11)
1991	33 (3.3-93)	3 (1-4.6)	8 (3-17)	18 (1.8-55)	3.6 (0-15)	2 (0-17)
1992	34 (6-97)	4 (0-22)	9 (4-42)	19 (3-91.4)	4.2 (0-24)	4 (0-32)
1993	42 (0.3-96)	5 (0-38)	15 (0.1-56)	21 (0.2-85)	3.8 (0-27)	4.8(0-45)
1994	51 (0.2-96)	6 (0-47)	10 (0.1-61)	23 (0-92.2)	4.2 (0-33)	3.7 (0-36)
1995	43 (0.2-92)	7 (0-53)	12 (0-57)	24 (0.1-82)	4.6 (0-35)	4.4 (0-37)
1998	21 (2-59)	8 (0-35)	14 (0-43)	15 (0-54)	4.8 (0-44)	2.4 (0-37)
Type d'hôpitaux						
Universitaires	27 (15-53)	10 (5-35)	17 (3-43)	22 (3-54)	5 (0-44)	3 (0-37)
Non universitaires						
>500 lits	6 (2-21)	8 (4-16)	10 (3-40)	5 (2-20)	7 (1-12)	2 (0-14)
300-500 lits	20 (8-59)	3 (0-26)	14 (0-38)	11 (5-49)	4 (0-21)	2 (0-24)
200-299 lits	27 (15-41)	9 (3-10)	7 (0-14)	11 (0-33)	7 (0-28)	8 (0-10)

Abbreviations: GM, gentamicine, FA, acide fusidique, FOS, fosfomycine, RA, rifampicine, PT, pristinamycine, SXT, triméthoprim-sulfaméthoxazole.

B. Rappels de quelques éléments essentiels de la résistance bactérienne

1. Introduction

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique. La résistance acquise résulte d'une modification du patrimoine génétique. Il peut s'agir d'une mutation qui peut entraîner, par exemple, une modification de la cible de l'antibiotique ou bien diminuer sa pénétration. Le plus souvent, il s'agit de l'acquisition d'ADN étranger pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes. L'acquisition d'ADN se fait le plus souvent par conjugaison. Elle se fait alors par l'intermédiaire de plasmides ou de transposons conjugatifs qui peuvent porter un ou plusieurs gènes de résistances. Dans certaines espèces comme le pneumocoque et les *Neisseria*, l'acquisition de l'ADN peut se faire par transformation. Le transfert des gènes de résistance par l'intermédiaire d'un bactériophage (transduction) est moins fréquent (Quintiliani *et al.*, 1999).

2. Les différents mécanismes de résistance

On peut classer les mécanismes de résistance en plusieurs groupes : inactivation de l'antibiotique par production d'enzyme inactivatrice, modification de la cible de l'antibiotique, diminution de la perméabilité membranaire et excrétion de l'antibiotique par efflux. De nombreuses bactéries peuvent combiner plusieurs mécanismes de résistance (Quintiliani *et al.*, 1999).

L'inactivation de l'antibiotique est un mécanisme de résistance fréquent. Par exemple, les β -lactamases sont des enzymes qui inactivent les β -lactamines par ouverture du noyau β -lactame. Il en existe une grande variété et leur classification peut varier suivant les β -lactamines qu'elles hydrolysent (pénicillinase, céphalosporinase), suivant leur sensibilité à divers inhibiteurs, ou suivant qu'elles sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques (Livermore, 1995). Selon les cas, la production de β -lactamase peut être constitutive (Fournier *et al.*, 1999) ou inducible (Bennett *et al.*, 1993). Son niveau de production est variable. Lorsque le niveau de production est faible, la résistance peut ne pas être détectable sur l'antibiogramme par les critères habituels.

Des mutations au niveau des gènes des β -lactamases peuvent modifier leurs propriétés (Lartigue *et al.*, 2002). Leur niveau de production peut être augmenté. C'est le cas des céphalosporinases dérégulées que l'on rencontre surtout chez *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* et *Pseudomonas aeruginosa*. Leur spectre d'activité peut se modifier. C'est le cas des β -lactamases à spectre élargi, observées notamment chez *Klebsiella pneumoniae* mais aussi chez d'autres entérobactéries comme *Escherichia coli*. Enfin, les β -lactamases peuvent acquérir une résistance à leurs inhibiteurs.

D'autres enzymes inhibitrices agissent sur d'autres classes d'antibiotiques comme les enzymes inactivant les aminosides, les macrolides et apparentés.

La modification de la cible de l'antibiotique est un autre mécanisme de résistance fréquent, comme la modification des protéines liant les pénicillines membranaires (PLP) chez *Staphylococcus aureus*. La résistance à la méticilline (et à l'ensemble des β -lactamines) est due à la présence d'une PLP ayant une très faible affinité pour les β -lactamines (Mainardi *et al.*, 1998). Cette nouvelle PLP est due à l'acquisition d'un gène chromosomique appelé *mecA*. L'expression phénotypique de la résistance est variable (résistance hétérogène) et dépend des conditions de culture. La baisse de sensibilité aux β -lactamines chez pneumocoque est due à une diminution de l'affinité de certaines PLP pour les β -lactamines (Dowell *et al.*, 1999). Cette modification résulte de l'acquisition de fragments d'ADN étranger au niveau des gènes des PLP, donnant naissance à des gènes mosaïques, c'est à dire des gènes contenant alternativement des séquences appartenant normalement à l'espèce et des séquences provenant d'autres espèces.

La diminution de la perméabilité, autre mécanisme de résistance, est liée à des mutations qui peuvent entraîner la perte de certaines porines et de ce fait entraver la pénétration de certains antibiotiques. Les porines sont des protéines formant des pores dans la membrane des bactéries à Gram négatif et permettant le passage de certaines molécules hydrophiles (Pages *et al.*, 2003).

Le dernier mécanisme de résistance est **l'excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux**. Les systèmes d'efflux actif sont des mécanismes de transport

membranaire très répandus chez les organismes procaryotes. Physiologiquement, ils ont un rôle de détoxification du milieu intracellulaire, en exportant différentes substances nocives hors de la cellule bactérienne dont les antibiotiques (Li *et al.*, 1994). Les différents systèmes d'efflux retrouvés chez les bactéries se distinguent les uns des autres par la spécificité des substances transportées, par leur structure, par le type d'énergie nécessaire à leur fonctionnement et, enfin, par leur expression génétique inductible ou constitutive (**Figure 2**).

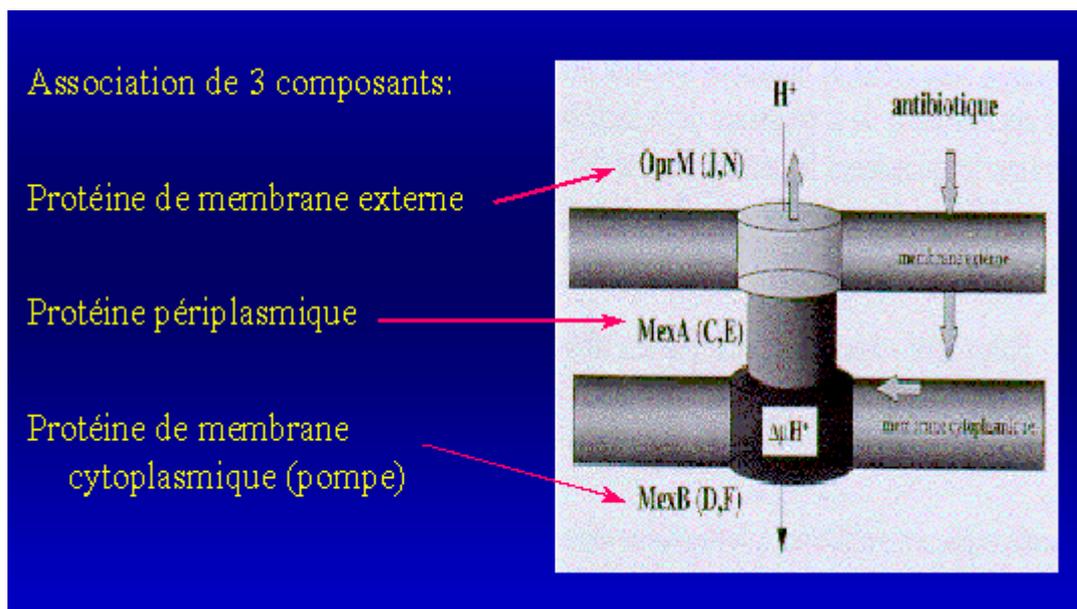


Figure 2. Les trois composants des pompes à efflux chez *P. aeruginosa*. La pompe dans la membrane cytoplasmique (MexB, MexD, ou MexF selon le système), la lipoprotéine de fusion membranaire (MexA, MexC, ou MexE), et la protéine tubulaire (OprM, OprJ ou OprN).

C. Définition du potentiel d'évolution vers la résistance

1. Introduction

L'évolution rapide de la résistance des bactéries aux antibiotiques amène à repenser les concepts qui président à l'évaluation des molécules avant leur mise sur le marché ou au cours de leur commercialisation. À chaque nouvelle classe d'antibiotiques mise sur le marché entre 1950 et 1990 (macrolides, tétracyclines, céphalosporines, fluoroquinolones, etc...), les bactéries ont été capables de répondre par de nouveaux mécanismes de résistance. Il s'agit donc d'une véritable « course-poursuite », menée entre nouveaux antibiotiques et nouvelles résistances, vis à vis de laquelle les experts infectiologues, pharmacologues, microbiologistes cherchent ensemble des

stratégies d'utilisation des antibiotiques les moins propices au développement de la résistance.

En effet, tant que l'évolution de la résistance était contrebalancée par la découverte et la mise au point d'antibiotiques aux performances améliorées, l'utilité et les bénéfices thérapeutiques immédiats étaient considérés comme les critères majeurs d'appréciation du service médical rendu. La raréfaction des nouvelles molécules rend la situation plus complexe. Le nombre de nouvelles classes d'antibiotiques n'augmentera que peu et la résistance bactérienne a toutes les chances de persister à son niveau actuel, voire d'augmenter encore (Andremont *et al.*, 2004).

Le potentiel d'évolution des populations bactériennes vers la résistance à un nouvel antibiotique nécessite de disposer d'informations prospectives sur la probabilité d'émergence d'une résistance spécifique à un antibiotique donné et sur la probabilité évolutive de cette résistance par deux mécanismes de «fabrication» de bactéries résistantes pathogènes:

- ✓ mode direct par sélection de bactéries résistantes au sein d'un foyer infectieux
- ✓ mode indirect par sélection de bactéries résistantes au sein de flores commensales qui comportent plusieurs centaines d'espèces puis transfert du mécanisme de résistance aux bactéries pathogènes.

2. Sélection de la résistance

Le pourcentage de souches résistantes à un antibiotique donné a souvent tendance à augmenter en fonction du temps d'utilisation de cet antibiotique. C'est le résultat de la *pression de sélection* des antibiotiques. En effet l'administration d'un antibiotique chez un individu entraîne la disparition, ou la diminution, des bactéries sensibles à cet antibiotique et favorise de ce fait la prolifération des bactéries ayant acquis des gènes de résistance, et des espèces possédant une résistance naturelle. La résistance sélectionnée par un antibiotique peut toucher, à des degrés divers, l'ensemble de la famille d'antibiotiques correspondante (Quintiliani *et al.*, 1999).

Ainsi des études ont évalué cette pression de sélection après exposition aux fluoroquinolones de patients hospitalisés dans un service de brûlés, notamment chez *P. aeruginosa* (Richard, 1994). Les facteurs de risque associés à l'augmentation de la résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* étaient l'exposition aux fluoroquinolones mais aussi la diffusion des souches résistantes par transmission croisée (situation épidémique).

Une étude récente (Damas, 2006) a également montré l'impact des antibiothérapies en réanimation (céphalosporines, fluoroquinolones et association amoxicilline-acide clavulanique) sur la survenue d'infections résistantes à ces molécules (**Tableau II**).

Tableau II. Résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* chez des patients de réanimation ayant reçu ou non une antibiothérapie (d'après Damas 2006)

	Traitement actif sur <i>P. aeruginosa</i>	
	N _o (n=50)	N _o (n=112)
Ceftazidime*	5,70	26,20
Pipéracilline-tazobactame*	4,70	17
Imipénème*	16	37,50
Ciprofloxacine*	25	54,50
Amikacine	4	4,50
Tobramycine	11,80	15,20

* $p < 0,05$ (test exact de Fisher)

Lorsque la pression de sélection des antibiotiques diminue, on peut observer dans certains cas une diminution du pourcentage de souches résistantes. Un des mécanismes en cause est la perte progressive de gènes de résistance situés sur des éléments génétiques instables. Lorsque le niveau de résistance acquise évolue par paliers, la pression de sélection contribue aussi à élever le niveau de résistance. L'augmentation du niveau de résistance peut relever de différents mécanismes :

- Augmentation du nombre de copies du gène de résistance
- Nouvelle mutation portant sur un gène déjà modifié
- Acquisition d'un deuxième mécanisme de résistance vis-à-vis de l'antibiotique (par exemple diminution de la perméabilité s'ajoutant à une modification de la cible)

Lorsque plusieurs gènes de résistance sont portés par un même élément génétique (par exemple un plasmide) l'utilisation d'un antibiotique sélectionne non seulement le

gène de résistance administré, mais aussi les gènes de résistance associés (Quintiliani *et al.*, 1999).

3. Diffusion de la résistance

Après la sélection de la résistance, divers facteurs peuvent contribuer à sa diffusion. Chez les bactéries, les gènes de résistance sont transmis à la descendance (transmission verticale). Ils peuvent aussi être transmis par conjugaison ou transformation à d'autres bactéries de la même espèce et plus rarement à des bactéries appartenant à des espèces différentes (transmission horizontale) ce qui réalise une transmission épidémique de la résistance. De nombreux gènes de résistance sont situés sur des transposons. Ce sont des éléments génétiques mobiles, pouvant se déplacer d'une région à une autre du chromosome, ou bien du chromosome vers un plasmide et inversement. Cette situation favorise encore la diffusion des gènes de résistance. Différentes catégories de transposons ont été rapportées (Mahillon, 1998).

Après la mise en évidence des plasmides et transposons, d'autres supports génétiques de la résistance bactérienne ont été rapportés dans les années 80. Les intégrons sont des structures génétiques complexes qui participent également à la diffusion de la résistance. Ces structures, susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques, sont très répandues chez les bactéries à Gram négatif (entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*). Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Ces dernières sont des éléments mobiles capables de s'intégrer ou de s'exciser par un mécanisme de recombinaison, spécifique de site, lié à l'intégrase. Leur mouvement et leur nombre permettent une mosaïque de combinaisons, responsables de la dissémination de la résistance au sein des bactéries. A la différence des plasmides, les intégrons sont incapables d'auto-réplication.

4. Méthodes d'analyse des risques de résistance

Les expérimentateurs ont progressivement introduit dans leurs études des modèles de plus en plus précis, s'inscrivant dans l'effort d'analyse prospective des risques de résistance. Ces méthodes peuvent être divisées en quatre groupes : les méthodes

bactériologiques, les méthodes écologiques, les méthodes pharmaco-épidémiologiques et enfin les modèles expérimentaux (Andremont *et al.*, 2004).

4.1. Les méthodes bactériologiques

Ces méthodes sont les plus anciennement utilisées. Elles ont toutes comme principe de mesurer l'émergence de la résistance après application d'une pression de sélection. Diverses techniques ont été proposées qui permettent de faire varier les concentrations d'antibiotiques et/ou les concentrations de l'*inoculum*.

Elles ont permis de définir le concept de « concentration prévenant les mutations » (CPM) (**Figure 3**, Drlica, 2003). Il s'agit de la concentration la plus basse permettant de ne pas voir émerger de mutants pour un *inoculum* important. Ce concept est intéressant car la CPM peut être comparée aux profils pharmacologiques et pharmacodynamiques de l'antibiotique au cours des traitements chez l'homme. Ceci permet de définir des fenêtres de sélection au cours desquelles le risque d'émergence de la résistance est maximal.

La réduction de la taille de ces fenêtres, par exemple en modulant les doses administrées ou leurs rythmes, peut permettre de contrôler l'émergence de la résistance. La caractérisation d'un certain nombre de paramètres, comme par exemple le rapport CPM/concentration minimale inhibitrice (CMI) peut permettre de mieux prévoir le comportement des antibiotiques vis-à-vis de l'émergence de la résistance.

Toutefois, pour intéressant qu'il soit, le concept de CPM ne peut bien évidemment s'appliquer qu'aux antibiotiques dont la résistance est due à l'apparition de mutations et il ne peut rien dire de l'évolution de la résistance par transfert horizontal. Pour le transfert horizontal, les méthodes bactériologiques ne peuvent que mesurer le taux de transfert *in vitro*, qui n'est que le reflet très imparfait de ce qui se passe *in vivo*.

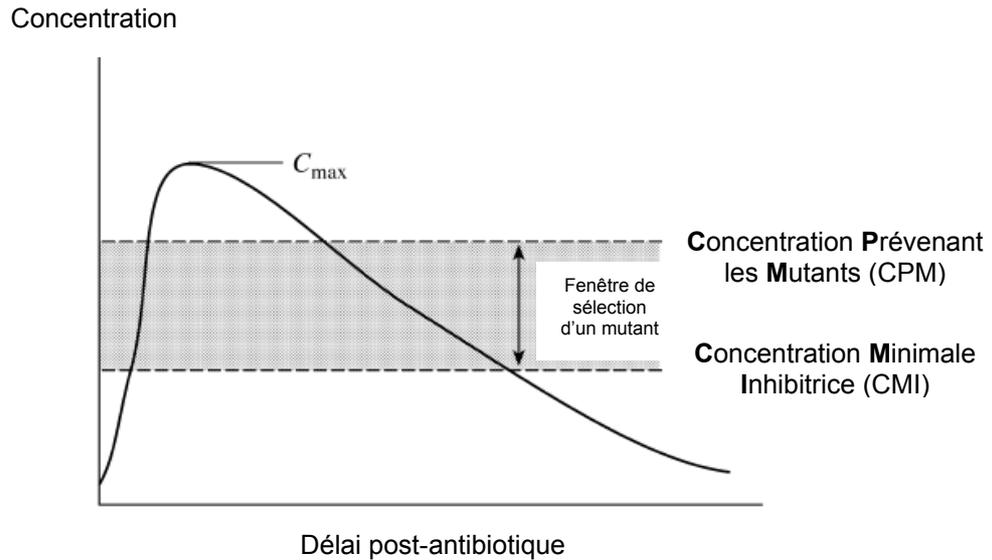


Figure 3. Evolution pharmacodynamique de l'émergence d'un mutant (d'après Drlica 2003). Probabilité pharmacocinétique selon des CMI et CPM arbitraires. La zone grisée indique la zone de sélection d'un mutant

4.2. Les méthodes écologiques

Les méthodes écologiques mesurent l'émergence de la résistance au sein des flores commensales au cours des traitements (Andremont, 2003). Ceci peut se faire soit chez des animaux de laboratoire (ce qui donne une grande liberté quant aux souches inoculées et à la modulation de la pression de sélection), soit chez des volontaires ou encore chez des malades.

La base logique de l'utilisation de ces méthodes est, qu'au sein des flores commensales, la multiplicité des espèces bactériennes et leurs concentrations élevées représente des conditions favorables pour l'émergence de la résistance. La physiologie des bactéries au sein des flores commensales est également différente de ce qu'elle est dans le milieu de culture *in vitro*. L'émergence de la résistance au sein des flores commensales est beaucoup plus fréquente qu'au sein des foyers infectieux, au cours d'un traitement donné. En outre, elle se produit chez tous les sujets traités qu'ils aient eu ou non un authentique foyer bactérien infectieux présent au moment du traitement. Enfin, le transfert horizontal de la résistance entre espèces commensales et pathogènes est bien démontré pour de nombreux gènes de

résistance (résistance plasmidique) ainsi que pour des fragments de gènes (de protéines liant la pénicilline par exemple). Il pourrait également se produire dans le cas de mutations ponctuelles conférant la résistance aux quinolones. La limitation de l'utilisation des résultats pour la prédiction de l'émergence de la résistance chez les microorganismes pathogènes vient de ce que la méthode ne dit rien du rythme de transfert secondaire entre commensales résistantes et pathogènes sensibles.

4.3. Les méthodes pharmaco-épidémiologiques

Ces méthodes consistent à relier la consommation des antibiotiques dans une population donnée à la prévalence de la résistance aux antibiotiques dans cette population (Guillemot, 2001).

La mesure de la consommation d'antibiotique s'exprime en utilisant une unité internationale « Defined Daily Dose » (DDD). Une DDD est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), pour chaque dénomination commune, comme étant une posologie journalière de « référence » pour un adulte de 70 kg dans l'indication principale du médicament dans son utilisation en ville. Les limites de l'interprétation des résultats exprimés en DDD tiennent, par exemple, au fait qu'il s'agit d'une unité théorique qui ne peut pas correspondre à la réalité des pratiques, qu'il n'existe ni DDD spécifique de l'hôpital, ni de DDD adaptée à l'usage des antibiotiques en pédiatrie. Elle peut être assimilée à une extrapolation du nombre de jours de traitement et permet des comparaisons entre les classes d'antibiotiques, les années et les pays (Guillemot *et al.*, 2004).

Cela permet néanmoins d'observer et de quantifier la liaison entre l'une et l'autre (**Figure 4**, Harbarth *et al.*, 2001, **Figure 5**, Lòpez-Lozano *et al.*, 2000, **Figure 6**, Monnet *et al.*, 2001). Ces études montrent une relation parallèle entre la consommation d'antibiotiques et l'augmentation des résistances. Les méthodes pharmaco-épidémiologiques ont l'avantage de se situer au niveau « macro » et de permettre de suivre l'efficacité des stratégies des politiques d'antibiothérapies sur la résistance. Cette méthode globale est intéressante dès l'instant où elle « porte » sur de grands nombres (antibiothérapies et populations humaines).

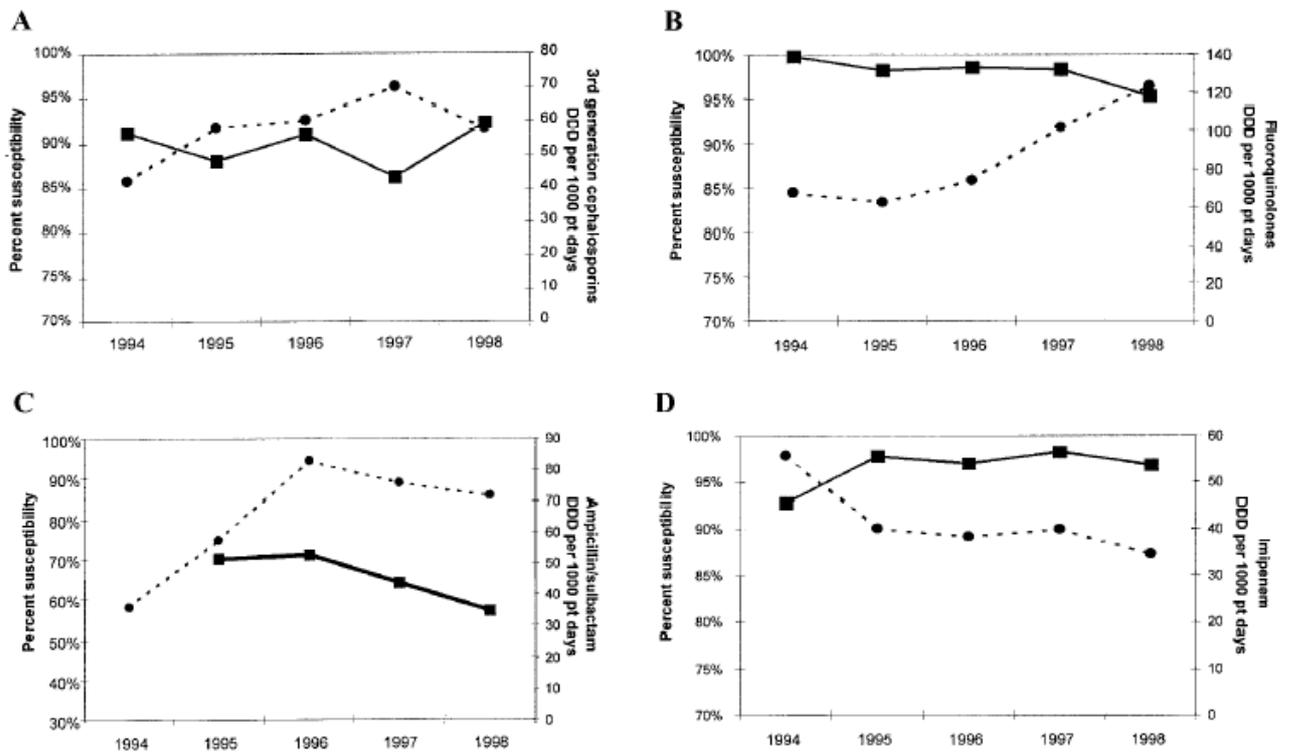


Figure 4. **A**, Sensibilité des entérobactéries aux céphalosporines de 3^e génération (ligne continue) et exposition en dose définie journalière (DDD, ligne en pointillé). **B**, Sensibilité des entérobactéries aux fluoroquinolones et exposition en DDD. **C**, Sensibilité des entérobactéries à l'association amoxicilline-sulbactam et exposition en DDD. **D**, Sensibilité de *P. aeruginosa* à l'imipénème et exposition en DDD (d'après Harbarth *et al.* 2001).

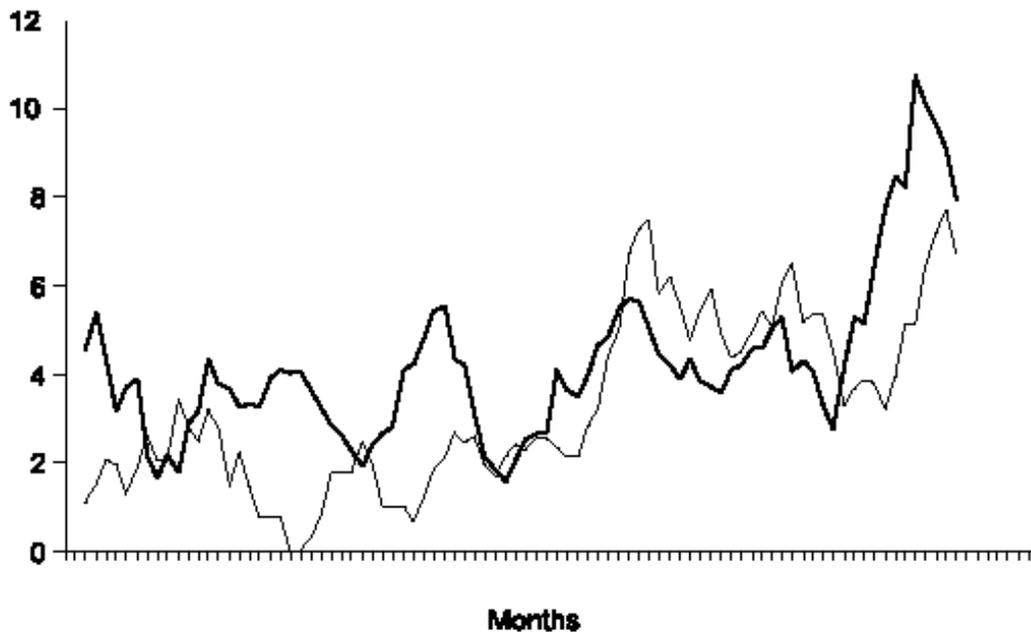


Figure 5. Consommation mensuelle de ceftazidime en DDD pour 1000 journées-patient (ligne en noir) et pourcentage de souches de bacilles à Gram négatif résistantes ou intermédiaires à la ceftazidime (ligne en clair) à l'hôpital Vega Baja, Espagne, 1991-1998 (d'après López-Lozano *et al.* 2000).

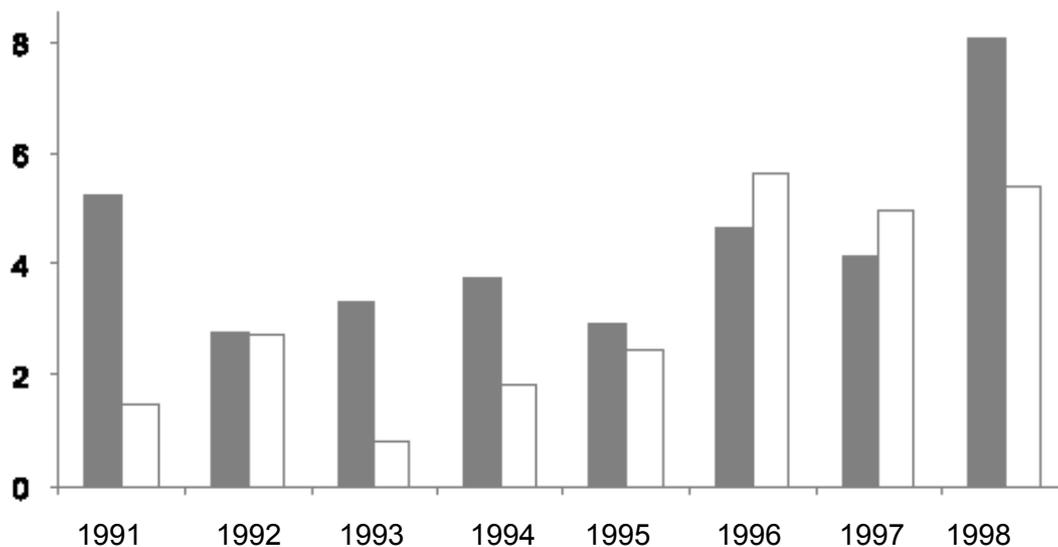


Figure 6. Consommation annuelle de ceftazidime en DDD pour 1000 journées-patient (histogramme noir) et pourcentage de souches de bacilles à Gram négatif résistantes ou intermédiaires à la ceftazidime (histogramme blanc) à l'hôpital Vega Baja, Espagne, 1991-1998 (d'après Monnet *et al.* 2001).

Monnet *et al.* (1998) proposaient un schéma (**Figure 7**) montrant l'utilité de la confrontation des données de la résistance et des consommations des antibiotiques, dans le but de décrire quatre situations distinctes, validant le concept qu'une forte consommation d'antibiotiques est associée à une augmentation des résistances, mais qu'une augmentation de la résistance avec une faible consommation soulève plusieurs axes d'amélioration, en particulier la maîtrise de la diffusion des bactéries résistantes aux antibiotiques.

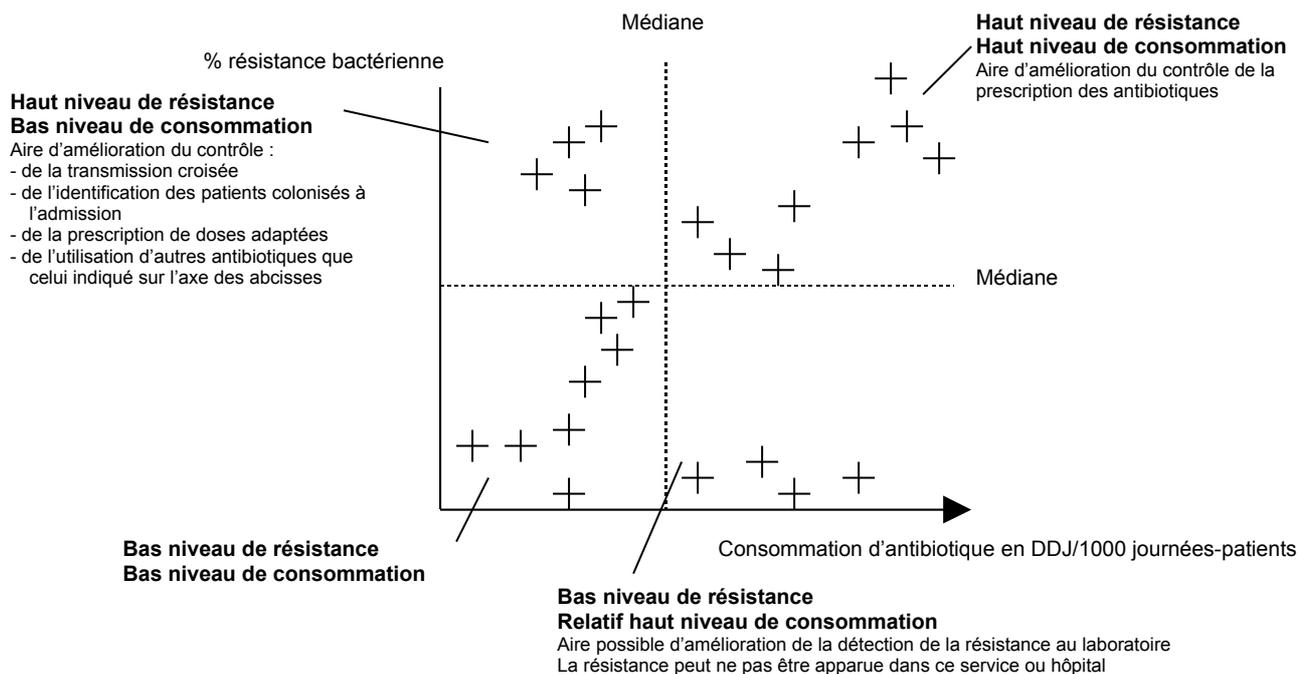


Figure 7. Utilité du croisement des données de la résistance bactérienne et de la consommation des antibiotiques (d'après Monnet *et al.* 1998).

4.4. Les modèles mathématiques

Les modèles mathématiques sont utiles pour comprendre et prédire l'émergence et l'évolution de la résistance chez un individu et dans des populations de patients communautaires ou hospitaliers. L'impact écologique global de l'antibiothérapie est probablement trop complexe à modéliser, compte tenu du nombre important de paramètres non identifiés. Cependant, les modèles peuvent contribuer à répondre à certaines questions si on est capable d'identifier les microorganismes commensaux principaux qui préviennent la colonisation de ceux qui sont la conséquence de la pression de sélection.

Des modèles prédisant la sélection de bactéries résistantes ont été développés en utilisant des seuils au-delà desquels le risque de la résistance augmente exponentiellement (Monnet, 2000). Ces modèles utilisent les séries chronologiques, techniques visant à ajuster des modèles mathématiques en fonction d'observations recueillies dans le temps, pour prédire une tendance future à partir des données observées. Ces méthodes ajustent les données pour prendre en considération

d'autres facteurs pouvant interférer avec les données observées dans le temps. Ces techniques permettent de prendre en considération les relations possibles entre les observations consécutives (Helfenstein, 1996). Cette méthode est appropriée quand les données sont mesurées de façon répétée dans le temps à des intervalles réguliers. En 1976, Box and Jenkins ont publié une méthode pratique **ARIMA (Autoregressive Integrated Moving Average model)**, permettant d'analyser le comportement temporel d'une variable en fonction de sa valeur, de ses tendances et variations antérieures. Depuis, des modèles de séries chronologiques ont été développés afin de prédire les variations de pourcentage de résistance chez certaines bactéries en fonction de l'exposition à certains antibiotiques. Ainsi, des modèles ont prédit le risque de développer des résistances aux céphalosporines de 3^{ème} génération chez les entérobactéries après une exposition à la ceftazidime (**Figure 8**, d'après Lòpez-Lozano *et al.*, 2000) ou chez *P. aeruginosa* après exposition à l'imipénème.

D'autres modèles plus simples permettent également d'analyser la résistance bactérienne en fonction de l'exposition aux antibiotiques en utilisant le modèle de Cox (**Figure 9**) ou la régression linéaire (**Figure 10**) (Harbarth *et al.*, 2001).

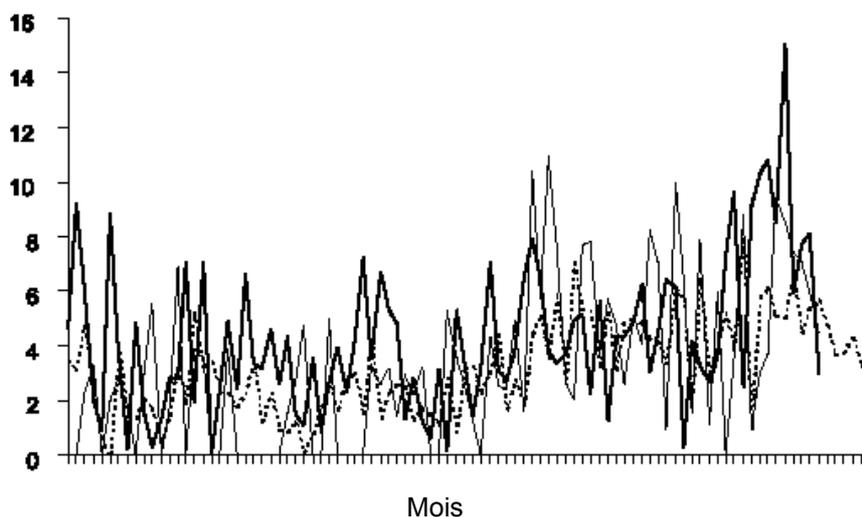


Figure 8. Consommation mensuelle (observée) de ceftazidime en DDD pour 1000 journées-patient (ligne noire) et pourcentage (observé, ligne grise) et prédit par modélisation (ligne en pointillé) de souches de bacilles à Gram négatif résistantes ou intermédiaires à la ceftazidime à l'hôpital Vega Baja, Espagne, 1991-1998 (d'après Lòpez-Lozano *et al.* 2000).

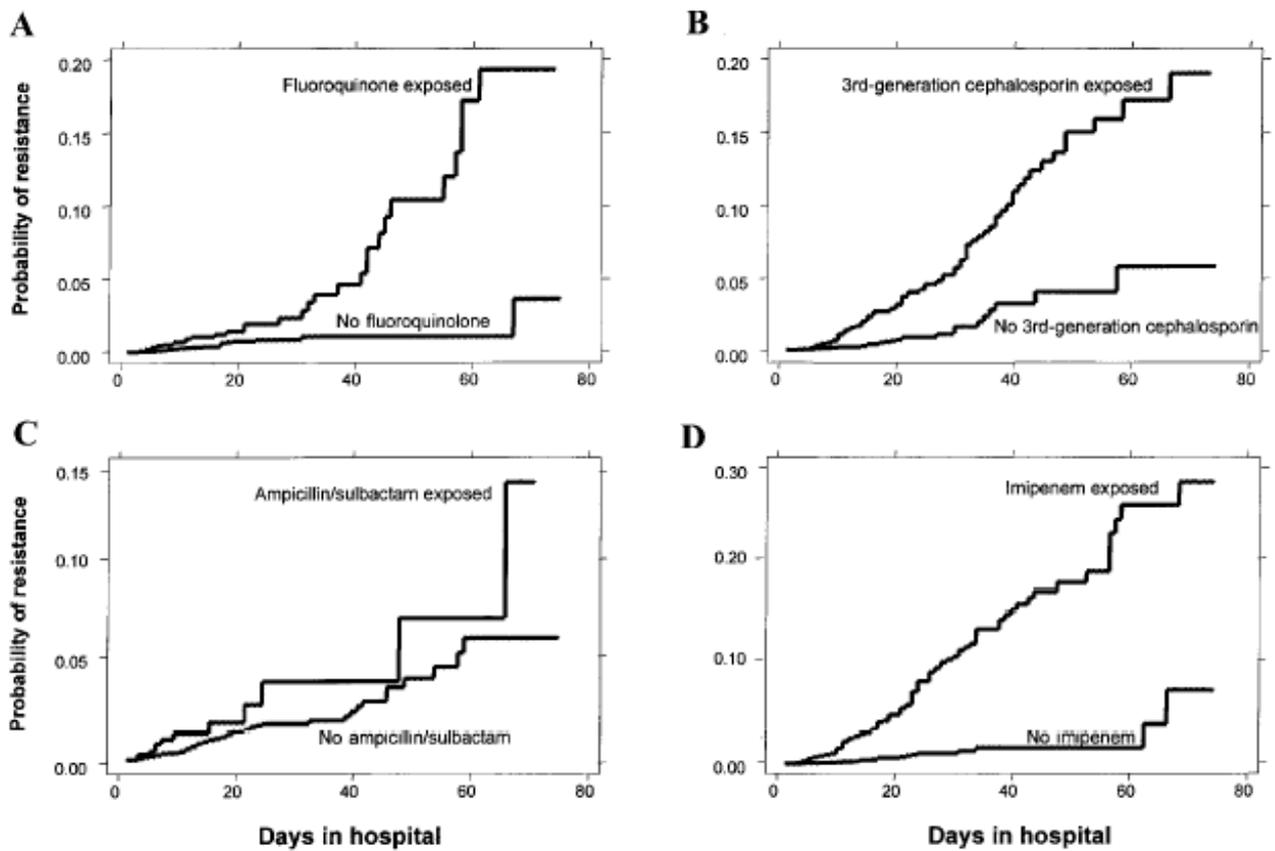


Figure 9. Probabilité cumulée de résistance bactérienne à 75 jours aux (A) fluoroquinolones, (B) aux céphalosporines de 3^{ème} génération, (C) à l'association ampicilline-sulbactam et (D) à l'imipénème rapportée à l'exposition à ces mêmes antibiotiques. Données de Utah Medical Center, 1994-1998 (d'après Harbarth *et al.* 2001).

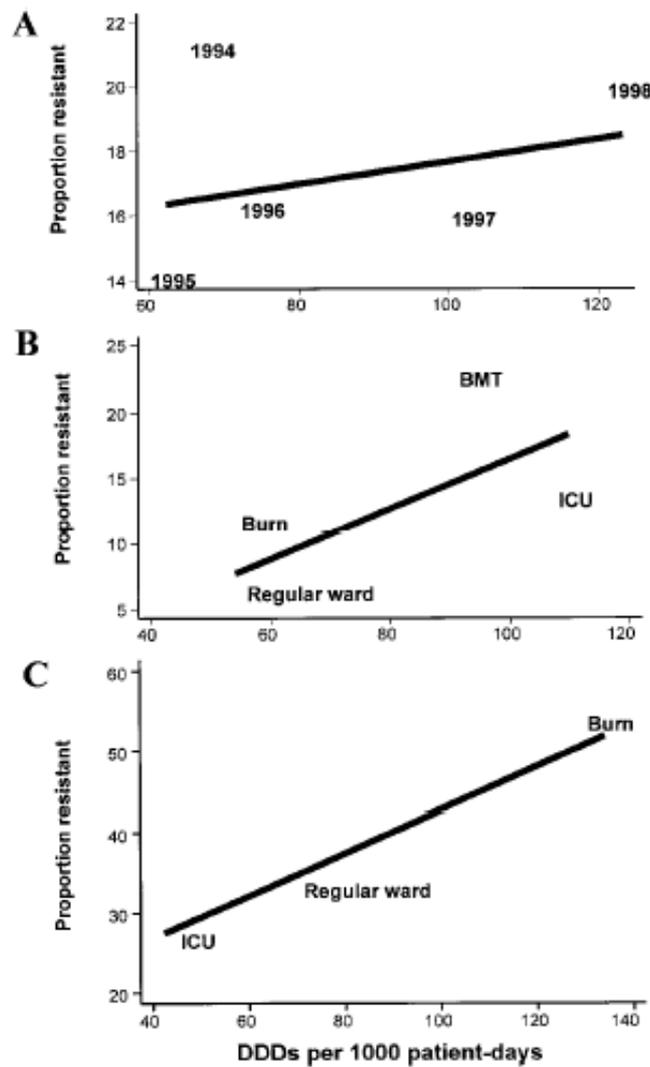


Figure 10. **A**, Analyse de la résistance de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones, stratifiée par année. Coefficient de régression linéaire ($R^2=0,1$ ($y=16+0.0035 \times DDJ$)). **B**, Analyse de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3^e génération, stratifiée par services. $R^2=0,66$ ($y=0,2+0,17 \times DDJ$). **C**, Analyse de la résistance des entérobactéries à l'association ampicilline-sulbactam, stratifiée par services. $R^2=1,0$ ($y=26+0,16 \times DDJ$) (d'après Harbarth *et al.* 2001).

4.5. Les surveillances épidémiologiques

Selon les Centers for Disease Control and Prevention (CDC), la surveillance représente un état de vigilance continue, étudiant la distribution et l'évolution de l'incidence de maladies à travers le recueil continu, l'analyse, et l'évaluation de données de santé publique (Thacker, 1996). La surveillance comprend également la diffusion régulière des résultats analysés aux personnes qui ont participé à cette surveillance ainsi qu'à celles qui en ont besoin. Le concept moderne de surveillance a été adopté en 1968 à l'occasion de la 21^{ème} assemblée de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), à partir de trois critères de base : le recueil systématique de données, la validation et l'analyse des données recueillies et la diffusion de l'information par l'intermédiaire de rapports épidémiologiques (Declish *et al.*, 1994).

Les surveillances de la résistance aux antibiotiques peuvent avoir plusieurs objectifs, comme de suivre les tendances, identifier des résistances émergentes, ou détecter de nouveaux patients colonisés. Les systèmes de surveillance doivent être continus, prospectifs, fournir des données spatiales et temporelles et évaluer les stratégies de contrôle et de prévention de la résistance. Aujourd'hui, peu de systèmes internationaux de surveillance de la résistance bactérienne semblent répondre à ces définitions. Monnet, dans un article publié en 2000 dans *International Journal of Antimicrobial Agents*, tentait de comparer les principaux systèmes de surveillance de la résistance existant à l'époque en Europe.

L'OMS par « The Anti-Infective Drug resistance and Containment Team » au sein du « Department of Communicable Disease Surveillance and Response » à Genève gère The Antimicrobial Resistance Monitoring Programme. Parmi d'autres objectifs, ce programme assiste les pays dans la formation et le renforcement des laboratoires à détecter des microorganismes résistants, réalise la promotion des systèmes de surveillance de la résistance bactérienne et assure des contrôles qualité. A partir d'un réseau informatique **WHONET**, les utilisateurs peuvent standardiser leurs méthodes de détection et sont soumis régulièrement à des contrôles de qualité externes (Stelling *et al.*, 1997).

L'European Antimicrobial Resistance Surveillance System (**EARSS**) a été créé en 1998 par la Commission Européenne pour établir un réseau de surveillance de la résistance visant des actions de santé publique. La période de mise en route et de faisabilité étudiait la résistance chez *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* (Goettsh *et al.*, 2000). La seconde phase incluait des contrôles qualité externes aux participants pour valider les méthodes de détection de la résistance. Le développement de système de transfert de données en particulier par la diffusion électronique des données a ensuite été développé.

Un autre projet appelé European Surveillance of Antibiotic Resistance (**ESAR**) est promu par European Society of Biomodulation and Chemotherapy depuis 1999. Il a également été créé par la Commission Européenne pour établir un réseau sentinelle de laboratoires capables de détecter et de prévenir rapidement à travers l'Europe la dissémination de nouveaux mécanismes de résistance pouvant être responsables d'épidémies.

En 1997, le service Hospital Infection Program (HIP) aux CDC créa l'International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance (**INSPEAR**) qui incluait rapidement plus de 135 hôpitaux dans 35 pays à travers le monde (Richet *et al.* 2001). Le principal objectif était d'être un système d'alerte pour l'émergence de la résistance, de rapidement diffuser les informations concernant les nouvelles technologies et d'apporter une assistance technique aux laboratoires à travers le monde.

The Surveillance NetworkTM (**TSN**) a démarré aux USA en 1992 et a installé une antenne européenne à la fin des années 90. Combinant une expertise microbiologique et une mise à jour des nouvelles informations et des techniques de communication, cette surveillance collecte des données par voie électronique à partir d'un réseau de laboratoires dans chaque pays participant (plus de 200 hôpitaux aux USA) (Jones *et al.*, 2004). Chaque demande était l'objet d'une réponse immédiate sur le site internet TSNTM.

Enfin, le **SENTRY** surveillance comprend un réseau de laboratoires de microbiologie sentinelle qui adressent chaque mois 20 isolats consécutifs de toutes les espèces

bactériennes à partir d'hémoculture, et les 50 isolats consécutifs isolés de prélèvements respiratoires, de plaies et des urines à un centre coordonnateur. Ces laboratoires adressent également leur taux de résistance bactérienne, afin d'établir des comparaisons (Pfaller *et al.*, 1998).

Ces six systèmes de surveillance diffèrent dans leurs objectifs, leurs méthodologies et donnent des réponses différentes sous le même nom commun « Surveillance of Antimicrobial Resistance ». Péan et Jarlier 1999, de l'Observatoire National pour l'Evaluation de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques en France (ONERBA) précisait que les objectifs d'une telle surveillance devaient inclure (1) l'identification des différences de niveau de résistance au sein d'une même espèce bactérienne, (2) les données épidémiologiques de la résistance au sein d'une espèce bactérienne, (3) les facteurs de risque d'infections causées par des bactéries résistantes et (4) la prévalence, l'incidence et les caractéristiques des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR).

4.6. Les méthodes expérimentales

Les modèles d'infections expérimentales, d'abord développés pour apprécier l'efficacité thérapeutique, peuvent également servir pour étudier l'émergence de la résistance chez des bactéries infectantes, au sein de foyers infectieux (Lefort *et al.*, 2004). Dans ces modèles, « l'humanisation » des traitements en terme pharmacodynamique permet d'obtenir des informations dans des conditions proches de ce qui se passe chez les malades. Les modèles d'endocardites expérimentales chez le lapin de laboratoire sont les plus sophistiqués dans ce domaine et permettent surtout l'analyse du versant thérapeutique (Jacqueline *et al.*, 2003). D'autres modèles, comme la pneumopathie à *P. aeruginosa* chez le rat ont permis l'étude expérimentale de sélection de mécanismes de résistance par efflux sous traitement par fluoroquinolones comme la trovafloxacin et la ciprofloxacine (Join-Lambert *et al.*, 2001). Mais si ces méthodes offrent d'intéressants enseignements sur l'émergence de la résistance au sein des foyers infectieux en même temps que l'efficacité thérapeutique de l'antibiotique étudié et contribuent à l'évaluation pharmacodynamique de l'antibiothérapie, elles restent limitées par les coûts et les charges de travail qu'elles imposent.

D. Exposition des populations aux antibiotiques : impact sur la résistance bactérienne et diffusion des bactéries au sein des populations

L'exposition des populations humaines ou animales à de nouveaux antibiotiques favorise l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance puis la diffusion des bactéries résistantes dans ces populations (**Figure 11**, d'après Guillemot, 2001).

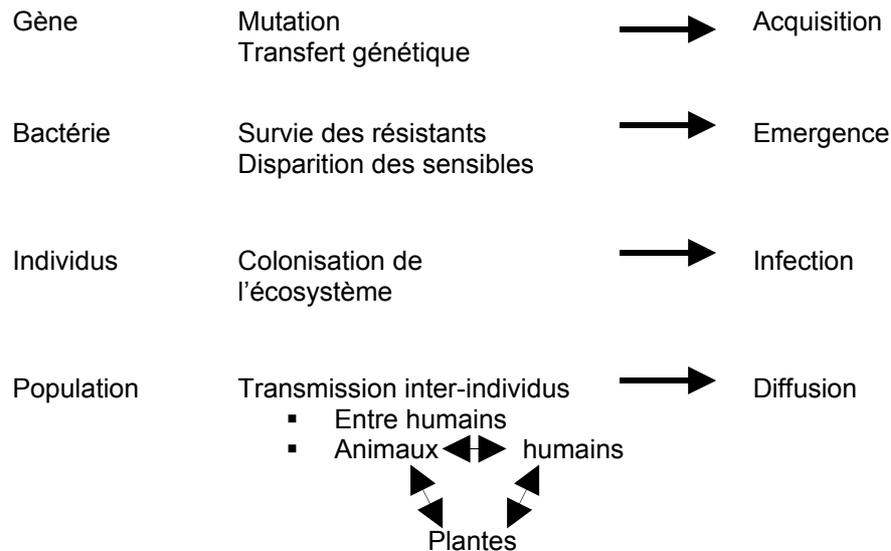


Figure 11. Différents niveaux de l'impact de l'antibiothérapie sur la pression de sélection aux antibiotiques (d'après Guillemot 2001).

Si l'émergence d'une nouvelle résistance est le résultat d'un événement génétique, pour comprendre la diffusion dans une population de la résistance d'une espèce bactérienne, il faut considérer que l'exposition des individus est double : exposition aux antibiotiques et exposition aux bactéries résistantes *via* la transmission inter-individuelle. Pour un modèle bactérie-antibiotique-mécanisme de résistance, ces deux facteurs sont *a priori* indépendants mais interagissent l'un avec l'autre et, c'est de cette interaction que naît dans les populations le risque évolutif de la résistance (Guillemot, 2001). Il ne peut y avoir d'augmentation de la fréquence de portage d'une bactérie résistante sans que les deux éléments soient associés, sauf à faire l'hypothèse que d'acquérir une résistance à un antibiotique confère à cette bactérie une aptitude particulière à se transmettre. En effet, la diffusion des résistances bactériennes dans une population passe nécessairement par une colonisation des

individus chez lesquels l'exposition à l'antibiotique confère un avantage écologique aux bactéries résistantes par rapport aux bactéries sensibles.

L'exposition d'une population à un antibiotique constitue la condition indispensable à l'apparition et à la diffusion d'une bactérie résistante à cet antibiotique. Les premiers arguments qui plaident en faveur d'une telle relation sont fournis par les études de corrélations écologiques (Baquero, 1995 et 1996) et les séries chronologiques (Chen *et al.*, 1999). L'association entre la résistance du pneumocoque aux β -lactamines et l'usage des antibiotiques illustre parfaitement cette première étape. Même si des corrélations sont observées entre l'exposition des populations aux antibiotiques et le taux de résistance de certaines bactéries (Chen *et al.*, 1999, Dowell *et al.*, 1997), ces études ne permettent ni de quantifier le risque, ni de faire la part entre ce qui est attribuable à l'usage des antibiotiques, et ce qui est attribuable la diffusion de ces souches dans les populations. Enfin, elles n'apportent pas d'arguments suffisamment forts pour affirmer la nature causale de la relation entre l'exposition aux antibiotiques et l'évolution des résistances bactériennes. En effet, et d'une manière plus générale, la causalité ne peut être documentée que si les résultats fournis répondent à certaines exigences :

- ✓ L'exposition précédant l'événement observé
- ✓ La cohérence avec les données scientifiques de nature biologique ou physiopathologique
- ✓ Reproductibilité et cohérence avec les autres études épidémiologiques menées sur la même question
- ✓ Spécificité et force de l'association (Importance du risque relatif, Relation dose-effet, Protocole de l'étude)

Ceci ne peut être que le résultat de recherches de pharmaco-épidémiologie considérant l'individu comme unité d'observation et non uniquement les zones géographiques (corrélations écologiques) ou temporelles (séries temporelles) (Guillemot *et al.*, 1998). Cependant, lors de situations d'observation d'augmentation de la résistance au sein d'une espèce bactérienne dans un service de soins donné, de nombreux auteurs ont montré le rôle de la transmission croisée (et donc de la diffusion clonale d'une souche) dans l'augmentation de la résistance, notamment

chez *P. aeruginosa* en réanimation (Bergmans *et al.*, 1998, Bonten *et al.*, 1999, Weist *et al.*, 2002, Bertrand *et al.*, 2001 et 2003) .

Dans leur étude, Bergmans *et al.* ont analysé 100 patients hospitalisés en réanimation, 44 patients dans l'USI 1 (période d'étude 40 jours) et 56 patients dans l'USI 2 (période d'étude 60 jours). Vingt trois patients étaient colonisés par *P. aeruginosa* (7 à l'admission et 16 en cours d'hospitalisation). L'étude génotypique a identifié 11 clones différents : 8 génotypes identifiés individuellement chez 8 patients, 2 génotypes identifiés chacun chez 3 patients et 1 génotype identifié chez 8 patients (**Figure 12**). Parmi les 8 patients ayant acquis le génotype 2, 5 patients étaient hospitalisés dans l'USI 1 et 3 patients dans l'USI 2, expliquant la diffusion clonale par transmission croisée entre les deux unités.

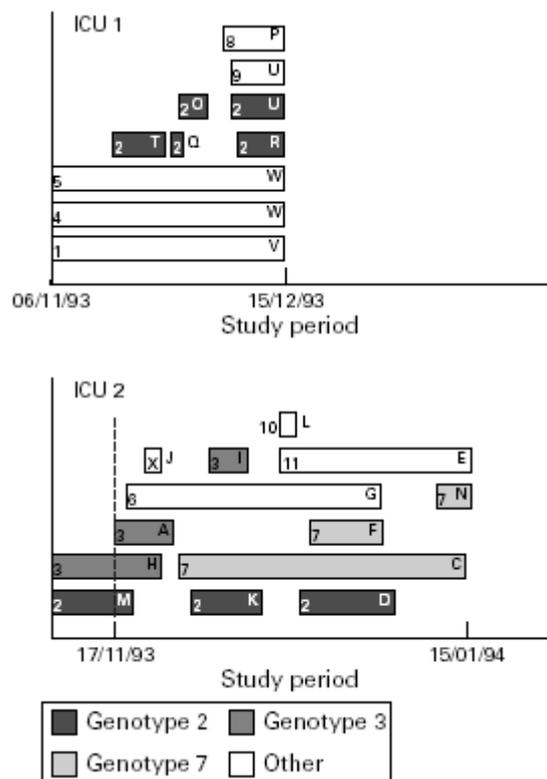


Figure 12. Colonisation par différents génotypes de *P. aeruginosa* en réanimation. Chaque histogramme horizontal représente le temps durant lequel un patient est resté colonisé pendant la durée de l'étude. Les génotypes colonisant plus d'un patient (types 2, 3 et 7) sont indiqués en noir ou en gris. Les histogrammes blancs représentent des génotypes différents n'ayant colonisé qu'un patient (types 1, 4 à 6, 8 à 11) (d'après Bergmans *et al.* 1998).

D'autres auteurs ont étudié la diversité clonale et la colonisation par *P. aeruginosa*, en étudiant des prélèvements systématiques et des prélèvements à visée diagnostique chez des patients hospitalisés en réanimation sur une période d'étude de 2 ans entre 1998 et 1999. Un total de 1686 prélèvements a été effectué chez 473 patients : 122 étaient positifs à l'admission et 351 ont acquis leur colonisation pendant leur séjour. Environ 50% des colonisations étaient acquises par transmission croisée (**Tableau III**).

Tableau III. Site de colonisation par des clones de *P. aeruginosa* identifiés en biologie moléculaire par PFGE (d'après Bertrand *et al.* 2003).

Nombre de porteurs ou colonisés/infectés identifiés par	Site initial de portage ou de colonisation/infection			
	Portage			Colonisation/infection
	Flore intestinale	Tractus respiratoire ^a	Les deux	
Clone unique (n=69)	30	38	0	1
Clone micro-épidémique ^b (n=32)	15	9	1	7
Clone épidémique ^c (n=66)	26	26	5	9
Clone épidémique majeur (n=41)	16	11	4	10
Total	87	84	10	27

^aIncluant les lavages broncho-alvéolaires et les aspirations naso-trachéales

^bGénotype incluant deux isolats non dupliqués

^cGénotype incluant plus de deux isolats non dupliqués

E. La relation entre usage des antibiotiques et portage d'une bactérie

1. Les bactéries communautaires

Concernant les bactéries communautaires, cette relation est aujourd'hui parfaitement documentée et quantifiée pour le pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) (Dowell, 1999). Il a été parfaitement démontré que c'est bien l'usage inapproprié d'antibiotiques à faible dose lors de la colonisation par *S. pneumoniae* qui contribuait de façon majeure à l'évolution de la résistance (Guillemot, 1998). Par ailleurs, ces risques ont été mesurés puisqu'on peut estimer que le risque de portage d'un pneumocoque de sensibilité diminuée est entre 3 à 6 fois plus élevé dans les semaines qui suivent la prise d'un antibiotique, comparativement au portage d'un pneumocoque de sensibilité normale (Dowell, 1999). Enfin, les résultats d'études pharmaco-épidémiologiques suggèrent que les dosages (posologies insuffisantes) et les durées d'administration jouent un rôle sur le portage du PSDP (Guillemot, 1998). L'ensemble de ces arguments avec ceux issus des études *in vitro* concoure à démontrer la relation de causalité entre l'usage des antibiotiques et le portage de PSDP. Dans un autre exemple, de nombreux

arguments de ce type ont aussi été rapportés pour la résistance chez des bactéries uropathogènes, notamment avec l'usage des fluoroquinolones (Thompson, 1994).

2. Les bactéries en milieu hospitalier

A l'hôpital, cette relation repose sur deux types d'arguments : (1) le niveau d'exposition des malades à un antibiotique ou à une classe d'antibiotiques est très élevé et donc fréquemment associé à une augmentation de la résistance des bactéries à cet antibiotique ou à cette classe d'antibiotiques; (2) un certain nombre de travaux montrent que la réduction de cette exposition au sein des populations hospitalisées est généralement suivie d'une diminution des taux des résistances. Cette question a notamment été étudiée pour les bacilles à Gram négatif comme *Acinetobacter baumannii* et entérobactéries (Rahal *et al.*, 1998, 2002, Urban *et al.*, 2000).

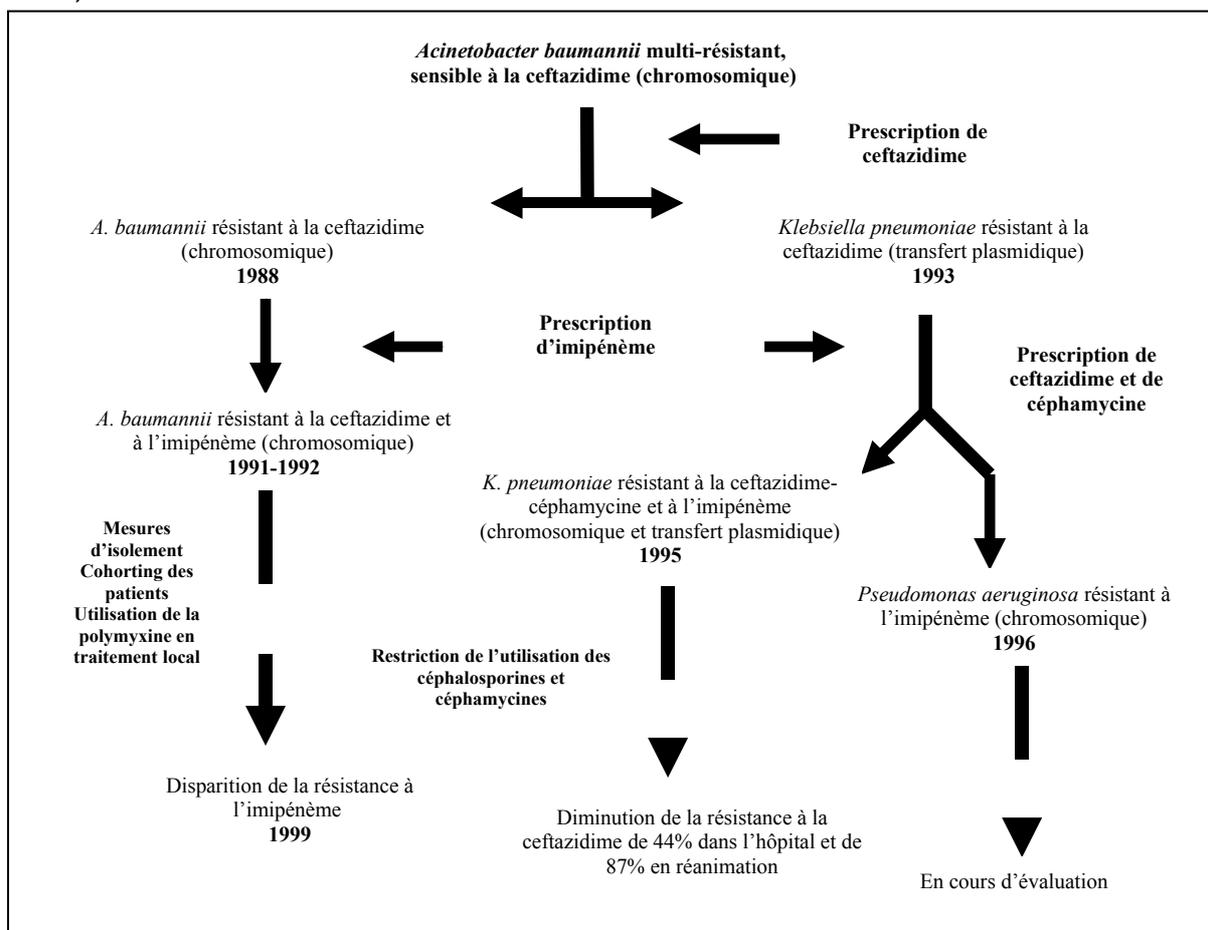


Figure 13. Evolution et contrôle de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif (Unité de soins intensifs, Hôpital de New York, Quens) (d'après Rahal *et al.* 2002).

Dans l'exemple de la résistance de *S. aureus* à la méticilline (SARM), l'influence de l'utilisation des antibiotiques par pression de sélection reste une question controversée (Monnet, 1998). Les stratégies hospitalières de maîtrise de la résistance du SARM ne prennent d'ailleurs qu'exceptionnellement en compte ce facteur et sont presque exclusivement centrées sur la limitation de la transmission inter-individuelle des bactéries, la prévention de la colonisation voire la décolonisation. Pourtant, le point le plus important sur la relation entre usage des antibiotiques et portage du SARM est qu'il n'existe pas d'études dont le protocole ait été spécifiquement élaboré pour y répondre alors qu'il existe effectivement quelques arguments suggérant que cette relation existe (Monnet, 1998, 2004). Certaines études retrouvent comme facteurs de risque indépendants de colonisation par SARM en réanimation, l'exposition aux antibiotiques (Ho, 2003). Récemment, en utilisant une approche «cas-témoin», il a été observé que l'exposition hospitalière aux fluoroquinolones multipliait par 4 le risque d'isolement d'un SARM comparativement à *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) (Weber *et al.*, 2003).

S'il a été parfaitement montré qu'à l'hôpital le transfert d'une souche d'un malade à un autre pouvait se faire *via* le personnel soignant, conduisant parfois à des phénomènes épidémiques, il n'existe pas d'études dont les résultats puissent expliquer l'avantage écologique du SARM par rapport au SASM. Néanmoins, sauf à faire l'hypothèse que la résistance à la méticilline est associée à une modification du SA à se transmettre, la seule explication possible reste l'exposition aux antibiotiques, notamment en milieu hospitalier.

II. Relation entre antibiothérapie et flore intestinale

A. Impact de l'usage des antibiotiques sur la colonisation digestive chez l'homme

1. Introduction

Un être humain adulte est composé de 10^{13} cellules environ. Les bactéries de son tube digestif sont dix fois plus nombreuses (10^{14}). L'écosystème intestinal est bien au premier rang de la résistance aux antibiotiques par sa densité bactérienne. Deux espèces anaérobies facultatives possiblement pathogènes – entérobactéries et entérocoques – sont maintenues en situation permanente de sous-dominance. Elles ne représentent qu'environ 10^7 germes par gramme de fèces. Si l'effet de barrière exercé par les formes anaérobies strictes est rompu, les populations sous-dominantes émergent : c'est un des mécanismes possibles de la sélection de résistance aux antibiotiques (Andremont, 2000). L'équilibre initial se rétablit à l'arrêt de l'antibiothérapie, ce qui suggère que les bactéries de la flore de barrière ne soient habituellement que transitoirement éradiquées, ou encore que leur croissance soit seulement inhibée durant le traitement.

L'impact de l'antibiothérapie sur l'écosystème intestinal est universel, quelle que soit l'indication de la prescription (bonne ou mauvaise) et quelle que soit la voie d'administration, orale ou parentérale. En effet, l'antibiotique administré par voie parentérale ou la fraction absorbée du traitement oral sont en partie ré-excrétés dans le tube digestif par l'intermédiaire de la sécrétion biliaire ou par excrétion intestinale directe.

Pratiquement tous les antibiotiques prescrits par voie orale sont actifs sur la flore intestinale et ceci d'autant plus qu'ils sont moins absorbés et restent dans la lumière digestive. Les antibiotiques administrés par voie parentérale sont actifs sur la flore lorsqu'ils ont une élimination biliaire et/ou subissent un cycle entérohépatique. Les perturbations de la flore apparaissent plus marquées lorsque les molécules utilisées sont actives sur les germes anaérobies. La concentration de l'antibiotique dans la lumière intestinale est évidemment importante. Elle est fonction du sort de

l'antibiotique dans la lumière intestinale. La notion de CMI prend entre autres une signification très particulière lorsqu'on envisage l'effet des antibiotiques sur la flore colique. La concentration d'un antibiotique est fonction de la fraction absorbée au niveau de l'intestin grêle et éventuellement au niveau du côlon. Elle est aussi fonction de l'action métabolique de la flore. Ainsi, la concentration des β -lactamines peut s'effondrer en présence de germe β -lactamases +, ce qui peut rendre inefficace un traitement présumé actif sur certains germes sensibles aux β -lactamines (Léonard *et al.*, 1989).

2. Élimination des bactéries sensibles

En éliminant des bactéries sensibles, l'antibiothérapie pourrait permettre la libération de sites d'adhérence sur l'épithélium, ce qui faciliterait l'implantation d'espèces concurrentes ou la colonisation par des micro-organismes exogènes. Une antibiothérapie parentérale par le céfotaxime fait quasiment disparaître les entérobactéries du tube digestif, avec parfois le recrutement de bactéries résistantes. Des données quantitatives expérimentales ont été obtenues chez la souris avec différentes céphalosporines en fonction de la fraction excrétée de la molécule dans les voies biliaires (Van Ogtrop *et al.*, 1991). L'administration parentérale pendant 9 jours de quatre céphalosporines (céfoperazone, ceftriaxone, ceftazidime, et céfépime) a entraîné la diminution du nombre de bacilles à Gram négatif du tube digestif de la souris (**Figure 14**), avec des variations en fonction de la molécule et de la dose administrée (**Tableau IV**).

Une étude récente étudiait l'amplitude de la modification de l'ADN fécal de la flore dominante chez six volontaires ayant reçu un traitement oral de 5 jours d'amoxicilline. Les échantillons de selles furent collectés à intervalles réguliers depuis le premier jour (D0) du traitement jusqu'à deux mois après la fin du traitement (De La Cochetière *et al.*, 2005). Cette exposition aux antibiotiques entraînait la modification de l'ADN bactérien dès le quatrième jour, avec un retour aux valeurs références de la flore dominante à deux mois. Les approches de biologie moléculaire permettent l'étude de cibles spécifiques de l'ADN bactérien. L'étude de l'ADN 16S donne accès à la diversité des espèces dominantes de la flore, avec l'analyse des génomes complexes des niches microbiennes, sans que les microorganismes soient cultivés.

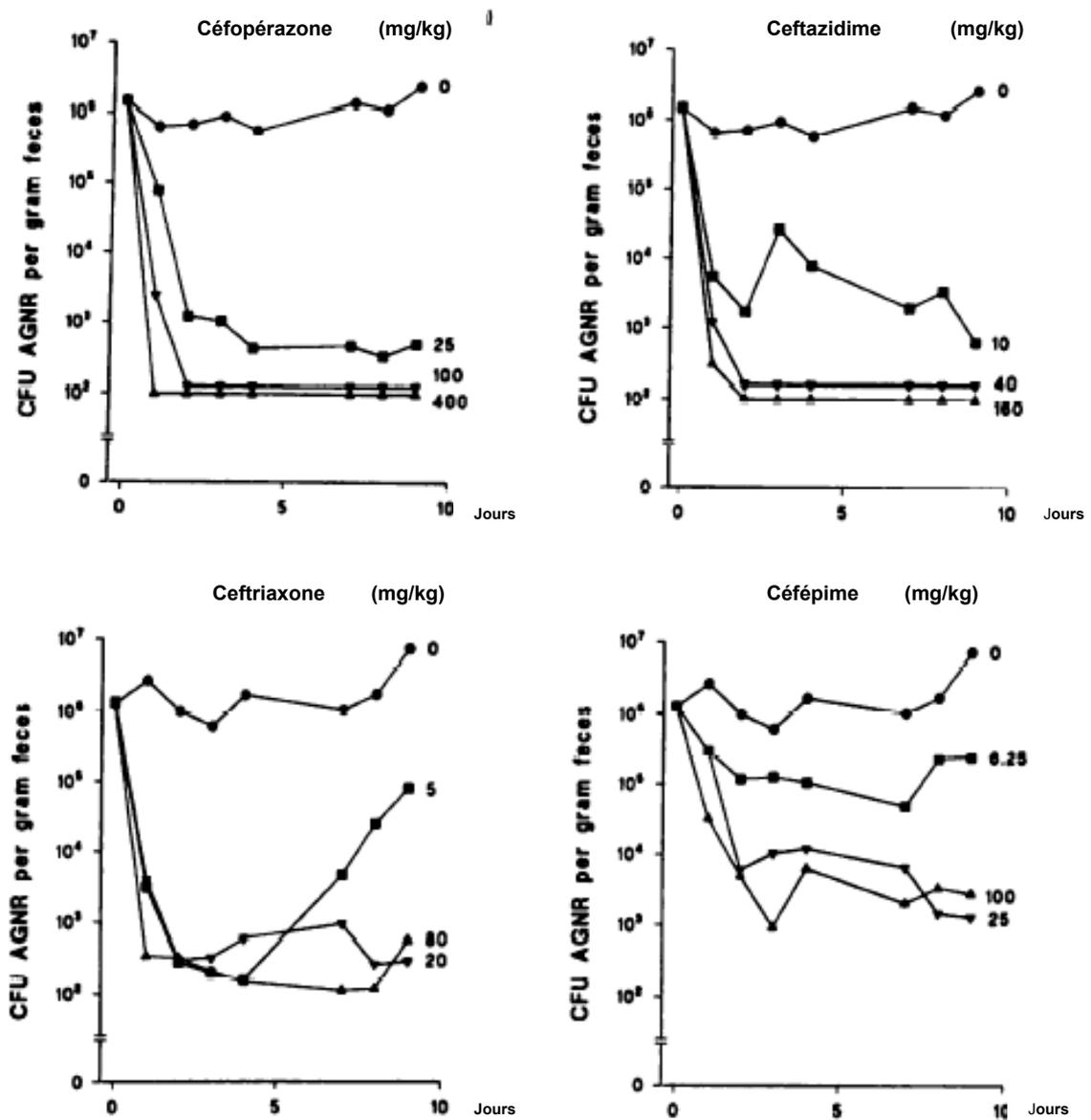


Figure 14. Effet du traitement parentéral de quatre céphalosporines pendant 9 jours sur le nombre de bactéries à Gram négatif (AGNR) dans la flore intestinale de la souris. Chaque symbole représente la moyenne par gramme de fèces de cinq souris. Le nombre à la fin de chaque ligne représente la dose quotidienne administrée (d'après Van Ogtrop *et al.* 1991).

Tableau IV. Impact de 10 jours d'antibiothérapie par céphalosporines sur le poids et le nombre total de bactérie par gramme de fèces au niveau du *caecum*, en fonction de la dose administrée (d'après Van Ogtrop *et al.* 1991).

Molécules	Dose (mg/kg)	Poids relatif dans le <i>caecum</i> (mg/g de fèces) ^a	N _o de bactéries/g (Log) au niveau du <i>caecum</i>
Contrôle		16,3 (3,0)	10,9 (0,2)
Céfopérazone	400	41,3 (12,2) ^b	8,8 (1,1) ^b
	100	19,9 (5,5)	10,7 (0,6)
Ceftazidime	25	18,4 (4,6)	11,0 (0,2)
	160	19,0 (3,0)	10,9 (0,2)
	40	16,7 (2,9)	11,0 (0,2)
Ceftriaxone	10	14,8 (2,8)	11,1 (0,1)
	80	22,9 (3,4) ^b	10,8 (0,2)
	20	21,9 (5,5) ^b	10,8 (0,3)
Céfépime	5	15,2 (2,4)	11,1 (0,2)
	100	17,2 (2,1)	11,0 (0,1)
	25	15,3 (2,7)	11,0 (0,1)
	6,25	15,1 (2,3)	11,1 (0,2)

^aLes écarts types sont donnés entre parenthèses; ^bDifférence significative avec les souris contrôles

3. Destruction des barrières anaérobies

Le deuxième mécanisme de l'effet écologique des antibiotiques est la destruction des effets de barrière. Une étude de la fin des années 1970 a montré l'évolution du nombre de *Pseudomonas aeruginosa* par gramme de fèces après l'introduction d'une décontamination intestinale par l'association de bacitracine, de néomycine et de streptomycine (Tancredi *et al.*, 1977). Relativement faible avant le début de la décontamination (10^5 /g de fèces), le nombre de *P. aeruginosa* est multiplié par 10^4 à 10^5 dès le dixième jour du traitement (**Figure 15**). Le retour à l'état antérieur intervient en une dizaine de jours après l'arrêt du traitement.

Cette augmentation considérable des bactéries intestinales pathogènes à Gram négatif peut avoir des conséquences individuelles très graves chez les sujets immunodéprimés ou neutropéniques, du fait de risque élevé de translocation et de bactériémies. Quand le nombre de polynucléaires est inférieur à $100/\text{mm}^3$ et que le malade présente des signes cliniques de bactériémies, le bacille à Gram négatif le plus probablement responsable est celui qui a la plus grande taille de population dans les fèces. Ainsi le pouvoir invasif n'est pas le même pour tous les genres bactériens présents dans le tube digestif. Bien que le nombre de bactéries anaérobies strictes des selles soit largement supérieur à celui des aérobies, leur part

de responsabilité dans les épisodes infectieux est minime ou mal évalué. *P. aeruginosa*, lorsqu'il colonise la flore intestinale des malades neutropéniques, pénètre facilement dans l'organisme, avec une plus grande fréquence que les entérobactéries présentes simultanément (Tancredi *et al.*, 1985).

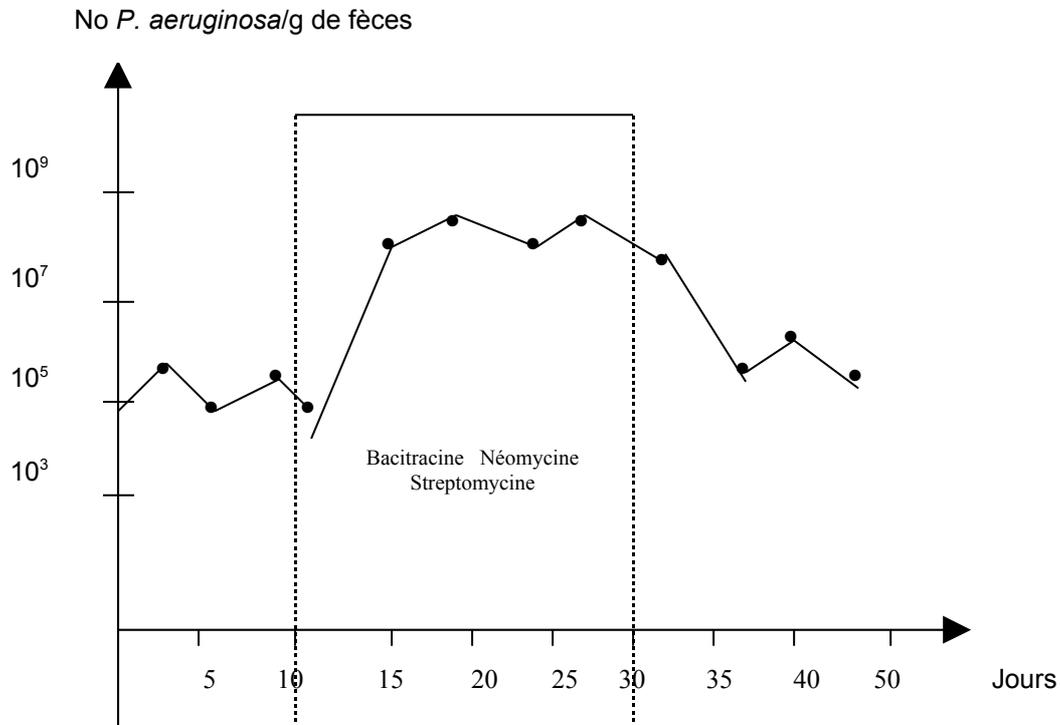


Figure 15. Influence du traitement antibiotique *per os* (Bacitracine-Streptomycine-néomycine) sur le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* dans les fèces de souris nues en isolateur (d'après Tancredi 1977).

4. Sélection d'entérobactéries résistantes

Les entérobactéries résistantes préexistent souvent à l'antibiothérapie, qui les sélectionne. L'étude de Van Ogtrop *et al.*, ayant évalué la diminution du nombre de bactéries à Gram négatif sensible au sein de la flore intestinale de souris, a également montré l'apparition sous traitement par céphalosporines d'une colonisation par *Candida albicans* (sous haute dose de céfopérazone et ceftriaxone) et par *Citrobacter freundii* résistant aux céphalosporines, notamment sous haute dose de céfopérazone, ceftriaxone et ceftazidime. La présence de cette bactérie résistante chez les sujets sains pourrait être liée au niveau de consommation d'antibiotiques dans la population à laquelle ils appartiennent, comme le suggère l'étude réalisée en 1990 par une équipe de Boston (Lester *et al.*, 1990). Les auteurs ont comparé dans différentes grandes villes du monde (Boston, Caracas, et Qin Pu en Chine), le pourcentage d'enfants bien portants porteurs d'entérobactéries dans

les selles et la nature des infections à l'hôpital. Paradoxalement, l'étude montre qu'il y a beaucoup de porteurs d'entérobactéries en Chine et en Amérique du Sud qu'aux USA. De plus, leur prévalence est bien corrélée à celle des bactériémies observées à l'hôpital. Les écosystèmes naturels sont ainsi les réservoirs des bactéries résistantes hospitalières. Une autre étude réalisée en Grèce confirme le rôle central de réservoir de la flore intestinale, montrant des prévalences élevées de portage intestinal d'*Escherichia coli* résistant à certains antibiotiques testés parmi une population d'enfants de la communauté âgés de 5 mois à 6 ans (Vatopoulos *et al.*, 1998).

Chez les personnes âgées, une étude finlandaise publiée en 1996 a analysé l'impact de la prescription de huit antibiotiques sur la résistance de bacilles à Gram négatif de la flore intestinale de 341 patients âgés de plus de 60 ans hospitalisés plus de 7 jours en 1993 et 1994 par rapport à des patients non hospitalisés (Leistevuo *et al.*, 1996). Les patients hospitalisés avaient un risque sept fois plus élevé (OR=6,9, IC_{95%}=3,5-13,5) d'avoir une colonisation intestinale par un bacille à Gram négatif résistant à l'ampicilline que les patients non hospitalisés. Lorsque que seuls les patients présentant de longue durée de séjour hospitalier étaient comparés aux patients non hospitalisés, l'OR était de 14 (**Tableau V**).

Tableau V. Impact de l'hospitalisation sur la colonisation de la flore intestinale par des bacilles à Gram négatif résistant (d'après Leistevuo *et al.* 1996).

Antibiotiques	Patients hospitalisés		Patients hospitalisés	
	< 7 jours (n=70)		> 7 jours (n=70)	
	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
Ampicilline	4,0 (1,9-8,4)	0,0002	14,3 (6,0-34,1)	0,0001
Céfuroxime	7,5 (2,7-20,8)	0,0001	7,5 (2,7-20,8)	0,0001
Ceftazidime	7,5 (0,9-63,7)	0,057	3,6 (0,4-33,4)	0,254
Triméthoprim	5,5 (2-14)	0,0003	22,3 (8,6-57,8)	0,0001
Sulfaméthoxazole	1,1 (0,5-2,2)	0,830	1,5 (0,8-3,0)	0,233
Tétracycline	2,0 (1-4)	0,064	5,2 (2,4-10,9)	0,0001
Ciprofloxacine	6,7 (0,8-55,2)	0,080		

Edlund *et al.* (2000) ont analysé l'impact des antibiothérapies orales sur l'écosystème intestinal dans le traitement des infections du tractus urinaire. L'ampicilline et l'association amoxicilline-acide clavulanique suppriment la flore aérobie et anaérobie avec sélection d'entérobactéries résistantes à l'ampicilline (**Tableau VI**). Plusieurs céphalosporines de 3^{ème} génération, comme le céfixime, le cefpodoxime, le cefprozil

et le ceftibuten réduisent le nombre d'entérobactéries et favorisent l'apparition d'entérocoques (**Tableau VII**). Les fluoroquinolones éliminent fortement les entérobactéries intestinales mais favorisent l'apparition des entérocoques et certaines bactéries anaérobies (**Tableau VIII**). Les auteurs démontrent l'importance de la prise en compte des conséquences écologiques sur la flore intestinale dans le choix d'un antibiotique pour traiter une infection du tractus urinaire.

Tableau VI. Impact des pénicillines orales sur la flore intestinale (d'après Edlund *et al.* 2000).

Antibiotique	Dose (mg/j)	Jours d'administration	Nombre patients	Effets sur			Développement de souches résistantes		
				Entérobactéries	Bacille Gram-Cocci Gram+	Anaérobies	Entérobactéries	<i>C. difficile</i>	<i>Candida spp.</i>
Ampicillin	1000-3000	5	10	↓↓	↓↓	↓	+	-	-
	500 × 3	5	10	↓	↓	-	+	-	+
Amoxycillin	2000	≥15	8	↓	↓	↓	-	-	+
	250 × 3	5	10	↑	-	-	-	-	-
	250 × 3	7	44	↑	-	↑	-	-	-
	500 × 3	7	10	-	↓	↓	+	-	-
	500 × 3	7	6	-	-	-	+	-	-
Co-amoxiclav	625 × 3	7	6	-	-	-	+	-	-
	27.5 mg/kg × 4	10-11	11	-	-	-	+	-	-
	750 × 3	3	6	-	-	-	-	-	-
	187.5 ^a × 3	5	4	↑	↓	-	+	-	-
	375 ^a × 3	5	4	↑	↓	-	+	-	-
	375 × 3	7	6	-	↓↓	-	+	-	-
Pivmecillinam	400 × 2	7	15	↓↓	-	-	-	-	-

↓↓, diminution importante (>4 log₁₀ cfu/g *faeces*); ↓, diminution modérée (2-4 log₁₀ cfu/g *faeces*); ↑, augmentation du nombre de microorganismes sous traitement; +, augmentation importante; -, pas de changement significatif.

Tableau VII. Impact des céphalosporines orales sur la flore intestinale (d'après Edlund *et al.* 2000).

Antibiotique	Dose (mg/j)	Jours d'administration	Nombre patients	Effets sur			Développement de souches résistantes		
				Entérobactéries	Bacille Gram-Cocci Gram+	Anaérobies	Entérobactéries	<i>C. difficile</i>	<i>Candida spp.</i>
Cefaclor	250 × 3	14	6	-	-	-	-	+	-
	250 × 3	7	10	-	-	-	-	-	-
	250 × 3	7	40	↑	↑	↑	+	-	+
Cefixime	400	14	6	↓	↑	↓	-	+	-
	200 × 2	7	10	↓	↑	↓↓	-	+	-
Cefpodoxime proxetil	200 × 2	7	10	↓↓	↓	↓	-	+	+
	500 × 2	8	8	↓	↑	↓	-	-	-
Ceftibuten	400 × 1	10	14	↓	↑	↓	-	+	+
Cephadrine	1000 × 2	7	6	-	↓	-	-	-	-

↓↓, diminution importante (>4 log₁₀ cfu/g *faeces*); ↓, diminution modérée (2-4 log₁₀ cfu/g *faeces*); ↑, augmentation du nombre de microorganismes sous traitement; +, augmentation importante; -, pas de changement significatif.

Tableau VIII. Impact des fluoroquinolones orales sur la flore intestinale (d'après Edlund *et al.* 2000).

Antibiotique	Dose (mg/j)	Jours d'administration	Nombre patients	Effets sur			Développement de souches résistantes		
				Entérobactéries	Bacille Gram-Cocci Gram+	Anaérobies	Entérobactéries	<i>C. difficile</i>	<i>Candida spp.</i>
Ciprofloxacine	500 × 2	7	12	↓↓	↓	-	-	-	-
	500 × 2	mean 42	15	↓↓	-	↓	+	-	-
	400 × 2	7	12	↓↓	-	-	-	-	-
	500 × 2	5	12	↓↓	↓	-	-	-	-
	50 × 4	6	12	↓↓	↓	-	-	-	+
	500 × 1	5	6	↓↓	-	-	-	-	-
	250 × 2	5-10	7	↓↓	-	-	-	-	-
	500 × 1	5-10	7	↓↓	-	-	-	-	-
	500 × 2	5	14	↓↓	↓	-	-	-	-
	250 × 2	3	17	↓↓	-	↑	-	-	-
Enoxacin	400 × 2	7	10	↓↓	-	-	-	-	+
Ofloxacine	400 × 1	7	10	↓↓	↓	↓	-	-	-
	400 × 1	5	5	↓↓	↓	-	-	-	-
Lomefloxacine	400 × 1	7	10	↓↓	-	↓	-	-	-
Levofloxacine	500 × 1	10	10	↓↓	↓	↓	-	-	-
Norfloxacine	100 × 2	7	10	↓↓	-	-	-	-	-
	200 × 2	7	10	↓↓	-	-	-	-	-
	400 × 2	7	10	↓↓	-	-	-	-	-
	100 × 2	7	10	↓↓	-	-	-	-	-
	200 × 2	5	10	↓↓	-	-	-	-	-
	400 × 2	5	10	↓↓	↓	-	-	-	-
	400 × 2	8	10	↓↓	-	-	-	-	-
	200 × 2	5	6	↓↓	-	-	-	-	-
	400 × 2	5	6	↓↓	↓	-	-	-	-
	200 × 2	7	10	↓↓	-	-	-	-	-

↓↓, diminution importante (>4 log₁₀ cfu/g *faeces*); ↓, diminution modérée (2-4 log₁₀ cfu/g *faeces*); ↑, augmentation du nombre de microorganismes sous traitement; +, augmentation importante; -, pas de changement significatif.

5. Acquisition de résistances chez l'individu

Les bactéries résistantes peuvent se multiplier dans la flore intestinale dans des délais très brefs. Dans une étude, des entérobactéries résistantes au sulfaméthoxazole et au triméthoprime ont été recherchées dans les selles avant et après traitement chez 136 sujets sains qui ont reçu cette association ou le triméthoprime seul ou un placebo pendant deux semaines pour la prévention de la diarrhée du voyageur (Murray *et al.*, 1982). Alors que le nombre total d'entérobactéries fécales n'a pas varié sous traitement, les auteurs constatent dans les groupes traités l'émergence de résistance de haut niveau au triméthoprime, alors qu'il n'existait avant le traitement aucune résistance. De plus, 96% des 165 souches d'*Escherichia coli* étaient résistantes à au moins quatre antibiotiques, 25% résistantes à sept. La résistance au triméthoprime était transférable pour 40% des souches testées. Enfin, deux semaines après la fin du traitement, la flore n'était pas encore revenue complètement à son niveau normal.

6. Effets expérimentaux des faibles doses

Les faibles doses d'antibiotiques sélectionnent lentement des bactéries résistantes dans la flore intestinale des animaux (Corpet *et al.*, 1989). Le modèle utilisé était celui de souris gnotobiotiques, c'est à dire de souris axéniques secondairement colonisées par des micro-organismes exogènes. Ces souris ont été colonisées par deux souches d'*Escherichia coli* l'une d'entre elle portant un plasmide de résistance (tétracyclines). De faibles doses de différents antibiotiques ont été administrées par voie orale pendant deux semaines dans différents groupes de souris. La composition de la flore intestinale a été ensuite étudiée de façon séquentielle et par comparaison à des souris témoins. Dans les groupes sur lesquels est exercée une pression de sélection (ampicilline, colistine, gentamicine, tétracycline ou streptomycine dans eaux de boisson), les entérobactéries résistantes augmentaient progressivement alors qu'elles diminuaient dans le groupe témoin (**Figure 16**). Des mécanismes analogues interviennent très probablement chez l'homme (Corpet, 1987).

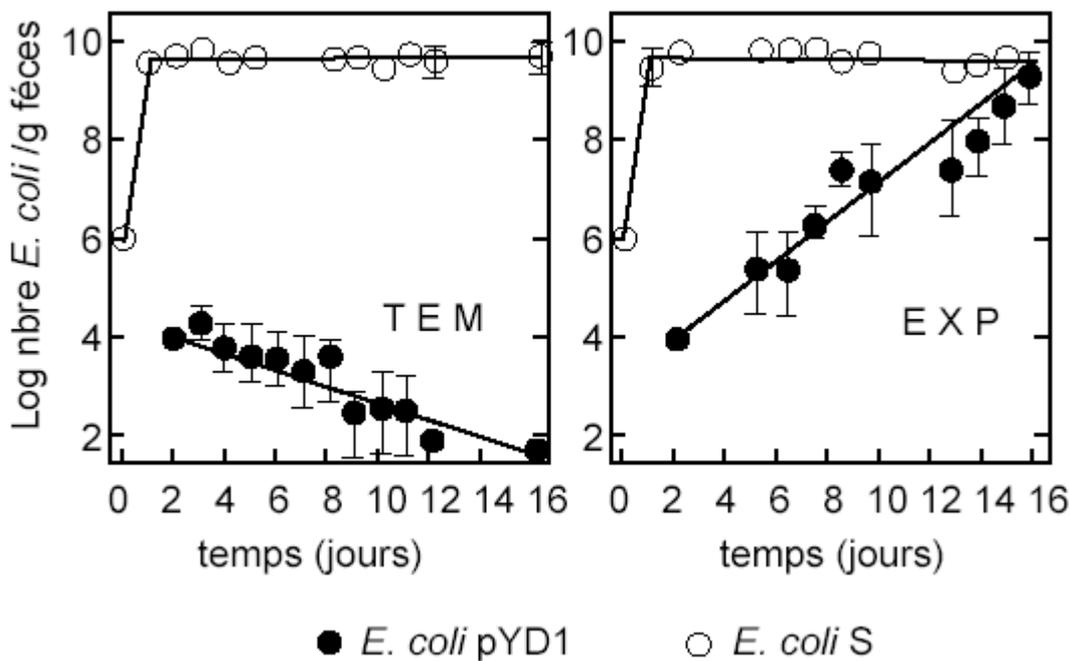


Figure 16. Comparaison séquentielle de la flore fécale dans un groupe de souris gnotobiotiques recevant de faibles doses d'antibiotiques par voie orale (EXP) et dans un groupe témoin (TEM). Les deux groupes de souris ont été colonisés en début d'expérience par une souche d'*Escherichia coli* sensible (S) et une souche porteuse d'un plasmide de résistance (pYD1) (d'après Corpet *et al.* 1987).

7. Effets de la durée du traitement

La durée de traitement est également importante pour le recrutement de bactéries résistantes. Une étude a analysé l'impact d'un traitement par céfotaxime sur le pourcentage d'entérobactéries résistantes à cette céphalosporine chez des patients non colonisés en début d'étude (Prévot *et al.*, 1986). Sur les 416 patients inclus dans un service d'hématologie, 66 (15,9%) ont acquis une colonisation par une entérobactérie résistante, 33 au céfotaxime. Les courbes de survie de Kaplan-Meier comprenant les 68 patients exposés au céfotaxime et les 31 patients non exposés, ont été réalisés séparément pour ces deux groupes de patients pour estimer le temps durant lequel les patients restaient non colonisés par une entérobactérie résistante au céfotaxime. La **figure 17** montre que seulement 26% des patients exposés au céfotaxime restaient non colonisés après un mois de traitement alors que cette proportion était de 77% dans le groupe non exposé.

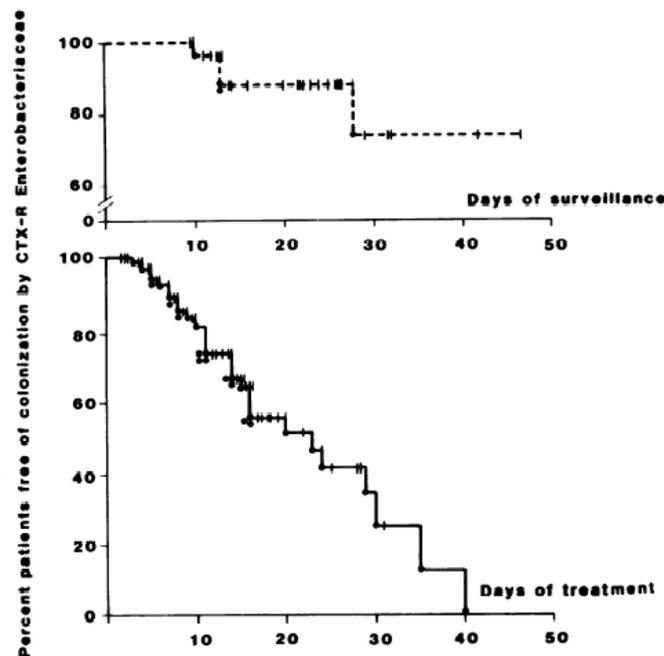


Figure 17. Courbes de Kaplan-Meier analysant la probabilité de rester non colonisé par des entérobactéries résistantes au céfotaxime dans deux groupes de patients, l'un exposé au céfotaxime (n=68) (—), l'autre non exposé au céfotaxime (n=31) (---) dans un service d'Onco-Hématologie. Statut à la fin de la période d'étude: •, colonisé par une souche résistante; |, non colonisé (d'après Prévot *et al* 1986).

B. Impact des antibiotiques utilisés en clinique vétérinaire sur la flore intestinale chez l'Homme

L'usage des antibiotiques en clinique vétérinaire s'est largement développé depuis les années 1950 et concerne aussi bien le domaine de la thérapeutique que celui de la zootechnie en tant qu'additifs alimentaires. En 1997, l'usage des antibiotiques en médecine humaine représentait 52% de la consommation totale européenne des antibiotiques, en médecine vétérinaire 33% et en tant que promoteur de croissance 15%, les tétracyclines étant les antibiotiques les plus utilisés (66% de la consommation totale) (Faye, 2005). L'utilisation d'antibiotiques en usage vétérinaire favorise la survenue de l'antibiorésistance chez les bactéries de l'animal. Les modalités d'utilisation des antibiotiques (en préventif ou comme additif alimentaire), le type d'antibiotique (antibiotique temps-dépendant à de faibles doses et pendant une durée prolongée) sont autant de facteurs qui vont favoriser le développement de l'antibiorésistance (Faye, 2005). L'animal ou ses produits dérivés de consommation, deviennent ainsi de véritables pools de germes résistants capables de passer chez l'homme. Le transfert de l'antibiorésistance peut s'effectuer simplement par passage direct de bactéries résistantes de l'animal à l'homme, c'est le cas général des bactéries zoonotiques (*salmonella*, *campylobacter*). D'autres mécanismes plus complexes faisant appel aux mécanismes de diffusion des gènes de résistance peuvent être à l'origine de ce transfert animal-homme. Ce transfert de type indirect permettrait une propagation étendue de l'antibiorésistance car de nombreux échanges sont alors possibles entre bactéries provenant du même écosystème ou provenant d'écosystèmes différents (**Figure 18**, Faye, 2005). Actuellement, on ne peut pas quantifier la part de l'antibiorésistance issue de l'animal et responsable d'une antibiorésistance chez les bactéries pathogènes pour l'homme (Sanders, 1999).

Pourtant, l'une des sources possibles de diffusion chez l'Homme des entérocoques résistants à la vancomycine en Europe pourrait être d'origine alimentaire avec l'hypothèse d'un réservoir animal. L'utilisation de dérivés vétérinaires des glycopeptides, avec l'avoparcine, apparaît comme un élément possible de sélection des entérocoques résistants à la vancomycine et a conduit les instances européennes à supprimer cet antibiotique de l'alimentation animale (Perrier-Gros *et*

al. 1998). L'avoparcine a été utilisée en Europe pendant plus de vingt ans comme facteur de croissance, en supplémentation alimentaire. Elle aurait pu sélectionner les entérocoques de type *VanA* qui présentent, en effet, une résistance croisée à la vancomycine et à l'avoparcine. Ce serait le mode essentiel de dissémination des entérocoques résistants aux glycopeptides en Europe, mais on ignore si les souches animales d'entérocoques peuvent ou non s'implanter dans le tube digestif humain et réciproquement (Leclercq *et al.*, 1997). L'avoparcine n'a jamais été autorisée aux Etats-Unis, où les épidémies apparaissent plutôt liées à la diffusion de souches clonales au sein d'un hôpital ou entre hôpitaux, alors que le portage extra-hospitalier est faible ou inexistant. La sélection des souches pourrait être initialement due à l'utilisation importante de vancomycine en milieu hospitalier, en particulier par voie orale (Goossens, 1998).

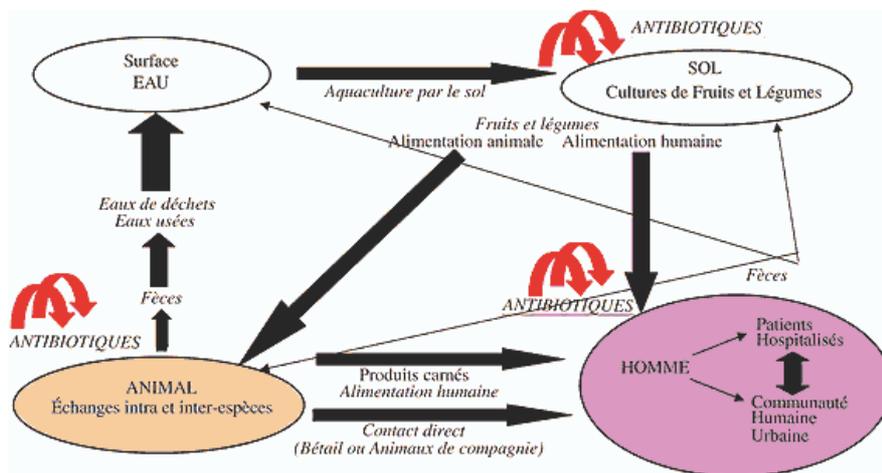


Figure 18. Complexité des interrelations entre les quatre écosystèmes (Animal/Homme/Sol/Eau) (d'après Faye 2005).

Les animaux de rente sont destinataires d'environ 90% des quantités d'antibiotiques à visée médicament vétérinaire, à l'exception des furanes, interdits en productions animales et des céphalosporines, majoritairement utilisées chez les animaux de compagnie. La quantité de médicaments vétérinaires vendue en France est en légère augmentation depuis 1999, notamment pour quelques familles antibiotiques telles que les aminoglycosides, macrolides et tétracyclines. Cependant la diversité des espèces visées par les prescriptions, l'existence de médicaments vétérinaires autorisés pour plusieurs espèces et l'absence à ce jour de définition harmonisée de DDD animales, rendent difficiles la comparaison et l'analyse des données (Guillemot *et al.*, 2004).

III. De la colonisation à l'infection chez l'homme: le cas de *Pseudomonas aeruginosa*

A. Introduction

Pour analyser la question de l'évolution des résistances bactériennes, la distinction (et la relation) entre portage et infection est particulièrement importante. A ce titre, *Pseudomonas aeruginosa*, agent pathogène relativement résistant aux antibiotiques et opportuniste, est un modèle d'étude intéressant. *P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif aérobie, ubiquitaire, présent dans l'eau, le sol, les plantes et notamment dans les légumes et les fruits. Bien qu'il ne fasse pas partie physiologiquement de la flore microbienne commensale de l'homme, il peut coloniser le tube digestif, l'oropharynx et les zones cutanées humides (aisselles, périnée) (Richet, 2003, Meybeck *et al.*, 2004). Le plus souvent, l'infection est secondaire à une phase de colonisation. Pour y parvenir la bactérie, très mobile grâce à son flagelle, va profiter d'une diminution des défenses de l'hôte comme la modification de la barrière cutané-muqueuse (brûlure, traumatisme, chirurgie, diminution de la clairance muco-ciliaire chez les mucoviscidosiques; modification de la flore dominante par l'exposition aux antibiotiques) et l'immunodépression (neutropénie, chimiothérapie).

Les pili de type IV, ainsi que d'autres adhésines jouent un rôle clé dans l'adhérence aux épithéliums et dans la fixation aux mucines. De plus, *P. aeruginosa* possède la propriété de former des biofilms, aussi bien sur des surfaces inertes (sondes urinaires ou d'intubation...) qu'au niveau des épithéliums. La matrice polysaccharidique du biofilm limite la diffusion des antibiotiques et augmente donc la résistance. De la même façon, elle procure une protection efficace contre les défenses immunitaires de l'hôte, en particulier contre la phagocytose et l'action du complément. La formation du biofilm est complexe et étroitement régulée. Ensuite, *P. aeruginosa* produit plusieurs substances qui, après la colonisation, vont entraîner des dommages tissulaires et favoriser ainsi sa dissémination (phase d'invasion).

B. Etude des réservoirs et de la colonisation de la flore intestinale chez l'homme

1. Etude des réservoirs naturels

De nombreuses études épidémiologiques ont analysé les réservoirs et les mécanismes de transmission de *P. aeruginosa* chez le patient à partir de l'environnement hospitalier. Ainsi, il a été démontré que les végétaux, comme la salade mais aussi d'autres aliments comme les champignons et les haricots (Curran *et al.*, 2005) mais aussi l'eau de boisson (Hardalo *et al.*, 1997) pouvaient contenir *P. aeruginosa* et être responsables de colonisation des tractus digestif et respiratoire. La colonisation gastro-intestinale des enfants dans la communauté est d'environ 6% et peut atteindre 57% chez les enfants hospitalisés (Yoshioka *et al.*, 1983). Des variations saisonnières de portage digestif peuvent être observées chez les adultes avec des taux de colonisation plus important en été qu'en hiver.

2. La colonisation de la flore intestinale chez l'homme

Ainsi, le risque de colonisation par *P. aeruginosa* augmente au cours de l'hospitalisation. Des études des années 1960 publiées dans le Lancet retrouvaient du matériel de réanimation (Basset *et al.*, 1965) ou de la nourriture et des médicaments (Shooter *et al.*, 1969) comme source de transmission de *P. aeruginosa*. Une étude récente (Gras-Le Guen *et al.*, 2003) identifiait un incubateur d'un lactarium pour décongeler les biberons à l'origine d'une épidémie de colonisations et d'infections à *P. aeruginosa* dans un service de réanimation néonatale et pédiatrique.

Une étude américaine a étudié l'incidence de la colonisation rectale et oropharyngée par *P. aeruginosa* chez 180 patients hospitalisés dans deux services de médecine et chirurgie et dans un service de réanimation pendant 5 mois (Murthy *et al.*, 1989). Quarante deux pour cent des patients étaient colonisés à l'admission, 11% pendant l'hospitalisation (pour les patients négatifs à l'admission). Le taux de colonisation était deux fois plus élevé en service de chirurgie et en réanimation que dans le

service de médecine. L'âge > 65 ans, les antécédents de chirurgie digestive carcinologique et l'anémie étaient significativement associés au risque de colonisation digestive par *P. aeruginosa*.

Le portage intestinal de *P. aeruginosa*, rapporté dans une étude récente, ne variait pas à l'admission et 3 mois après la sortie des patients hospitalisés en dehors des services de réanimation (0,6% versus 0,5%), et avait même tendance à diminuer en cours d'hospitalisation (0,2%). Par contre, le portage augmentait jusqu'à 6,3% en fin d'hospitalisation en réanimation pour diminuer significativement à 2,4% à la sortie de l'hôpital, et disparaître un mois après la sortie du patient (**Tableau IX**, Filius *et al.*, 2005). Respectivement 23% et 25% des patients de réanimation et des patients hospitalisés en dehors des réanimations avaient reçu un traitement antibiotique dans les 3 mois précédant leur hospitalisation (7 et 5 DDJ/100 jours-habitant). Cette exposition aux antibiotiques passait à 180 DDJ/100 jours-patients pendant l'hospitalisation en réanimation et à 67 DDJ/100 jours-patients dans les autres services. L'association amoxicilline-acide clavulanique et les fluoroquinolones représentaient respectivement 53% et 11% de la consommation totale. Les auteurs constataient de grandes différences de prévalence de colonisation en fonction du temps et des services. Ils observaient une augmentation significative de la colonisation entre l'admission et la sortie de réanimation pour *Klebsiella* spp. et *P. aeruginosa* et une diminution significative pour *E. coli*. A la sortie de l'hôpital, les fréquences de portage des différentes espèces étaient identiques à celles observées à l'admission en réanimation, sauf pour *P. aeruginosa*. Au niveau oropharyngé, la colonisation à *P. aeruginosa* passait de 6% à l'admission à 13,2% à la sortie sans diminution ensuite à 1 et 3 mois après la sortie de l'hôpital. Les taux de prévalence les plus faibles pour *E. coli* étaient observés pendant l'hospitalisation en réanimation. L'exposition aux antibiotiques est l'un des facteurs pouvant expliquer la diminution du portage de bacille à Gram négatif sensible au-dessous d'un seuil de détection (Sullivan *et al.*, 2001), et l'apparition de bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques utilisés. Cette hypothèse est supportée par l'observation inversement proportionnelle dans les deux populations du niveau de prévalence de portage en fonction de l'exposition aux antibiotiques.

Tableau IX. Colonisation gastro-intestinale par des bacilles à Gram négatif aérobies pendant et après l'hospitalisation (d'après Filius *et al.*, 2005).

Caractéristiques	Valeurs pour les patients de réanimation (USI)					Valeurs pour les patients hors réanimation			
	Admission	Sortie USI	Sortie H	1 mois après sortie H	3 mois après sortie H	Admission	Sortie H	1 mois après sortie H	3 mois après sortie H
Nombre de patients	183	150	62	82	73	228	205	185	167
Ecouvillons positifs à bactéries à Gram négatif (n [%])	67 (37)	51 (34)	42 (67)	66 (81)	61 (84)	112 (49)	113 (55)	131 (71)	125 (75)
Nombre d'isolats	335	254	206	332	304	524	562	639	586
Bactéries à Gram négatif (%)									
<i>Enterobacter</i> spp.	2,4	3,1	1,5	3,6	2,3	3,4	2,7	2,5	3,6
<i>Escherichia coli</i>	83,9	68,5 ^b	84,0	79,2	85,2	89,5	83,8 ^c	85,6	87,7
<i>Klebsiella</i> spp.	9,0	20,1 ^b	5,8	10,5 ^d	7,6	3,1	9,3 ^c	6,3 ^d	3,1 ^e
<i>Pseudomonas</i> spp.		6,3 ^b	2,4 ^c	^d	^e	0,6	0,2		0,5
Autres	4,7	2,0	6,3	6,7	4,9	3,4	4,0	5,6	5,1

^bDifférence significative entre la sortie et l'admission en réanimation

^cDifférence significative entre la sortie de l'hôpital (H) et l'admission en réanimation ou hors réanimation

^dDifférence significative entre 1 mois après la sortie de l'hôpital et sortie de l'hôpital

^eDifférence significative entre 3 mois après la sortie de l'hôpital et sortie de l'hôpital

C. Relation entre la colonisation et l'infection à *P. aeruginosa*

1. Introduction

A partir de cette colonisation, le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* peut s'avérer redoutable chez les patients immunodéprimés, les patients des services des brûlés et les patients de réanimation bénéficiant de procédures invasives. Des auteurs ont étudié la relation entre colonisation et infection en analysant la présence de *P. aeruginosa* dans différents types de salades consommées par des patients d'un service d'Oncologie dans un hôpital de Rio de Janeiro (Correa *et al.*, 1991). Trente huit isolats issus des salades et 98 isolats cliniques des patients ayant consommé ces salades ont été analysés. *P. aeruginosa* était retrouvé dans 19% des prélèvements réalisés sur les salades, en particulier le sérotype O4 avec une pyocine PT10/b, également retrouvé dans les prélèvements cliniques. Les auteurs concluaient que les végétaux représentaient une source d'infections à *P. aeruginosa* pour les patients hospitalisés.

2. Rôle de l'environnement hydrique et transmission épidémique de souches de colonisation ou d'infection

De nombreuses publications entre 1998 et 2005 ont analysé le rôle de l'environnement hydrique dans la colonisation et l'infection par *P. aeruginosa* de patients hospitalisés en réanimation adulte. Certains auteurs suggèrent que les points d'eau jouent un rôle primordial dans la pérennisation de cette bactérie dans les services de soins intensifs (Bert *et al.*, 1998, Blanc *et al.*, 2004). D'autres auteurs soutiennent que la contamination de l'eau des lavabos par *P. aeruginosa* est rétrograde. Les souches proviennent du patient, mais pas du réseau d'eau général (Talon *et al.*, 2004). Mais la plupart des études indiquent que les points d'eau sont une source importante de *P. aeruginosa* en service de soins intensifs. Trautmann *et al.* (2005) ont comparé les résultats d'études analysant la proportion d'eau de robinets positive à *P. aeruginosa* sur le nombre total de robinet testés. La proportion de positivité des points d'eau variait de 9,7% (Blanc *et al.*, 2004), 18% (Ferroni *et al.*, 1998) à 42% (Trautmann *et al.*, 2005), 58% (Reuter *et al.*, 2002), 62% (Vallès *et al.*, 2004) et 68% (Trautmann *et al.*, 2000). Le taux de patients colonisés par une souche clonale présente au niveau des points d'eau variait de 14% (Berthelot *et al.*, 2001) à 50% (Trautmann *et al.*, 2005). D'autres études n'identifient qu'un lien épidémiologique faible entre les souches environnementales et les souches cliniques (Talon *et al.*, 1998, Bergmans *et al.*, 1998). Dans l'étude de Vallès *et al.* (2004), la souche environnementale était à l'origine de la colonisation des patients dans 37,5% des cas, mais n'était pas retrouvée dans les prélèvements respiratoires des patients ayant développé une pneumopathie acquise sous ventilation causée par *P. aeruginosa*, suggérant une origine endogène.

Le rôle de l'environnement hydrique est donc indéniable mais les différentes études montrent une situation hétérogène selon les hôpitaux dans le risque de colonisation hospitalière des patients. Cependant, il existe une augmentation de la diffusion clonale des souches par transmission directe manuportée de patient à patient dans les services à risque. Des auteurs ont investigué une épidémie de colonisations et d'infections à *P. aeruginosa* à partir de l'eau d'un robinet d'une chambre de patient (Deplano *et al.*, 2005). Pendant la période épidémique (6 mois), 9 patients furent colonisés et 9 autres infectés avec une souche multirésistante (dont trois sont

décédés de leur infection). Des contrôles environnementaux retrouvèrent la présence de *P. aeruginosa* mais la souche épidémique multirésistante fut isolée de l'eau du robinet d'une chambre d'un patient déjà connu colonisé avec cette souche (rétrocontamination ?). L'isolement de la souche épidémique sur les mains d'une soignante expliquait la transmission croisée entre les autres patients.

Dans une autre étude, une épidémie d'une souche clonale de *P. aeruginosa* O10 avait pour origine l'eau de l'incubateur d'un lactarium servant à décongeler les biberons (Gras-Le Guen *et al.*, 2003). Cette souche clonale était à l'origine de 14 infections dont 4 graves chez des patients préalablement colonisés sur une période de 13 mois. Le dépistage des selles de l'ensemble des patients hospitalisés et des nouveaux entrants, instauré pour connaître l'étendue de l'épidémie et évaluer les mesures de contrôles mises en place, identifia 17 autres enfants colonisés non infectés.

D'autres études ont montré le rôle de la transmission croisée de patient à patient, sans exposition environnementale. Boukadida *et al.* (1991) ont investigué une épidémie de colonisation intestinale par *P. aeruginosa* dans un service de soins intensifs d'Hématologie. Les selles de quatre enfants immunodéprimés ayant bénéficié d'une décontamination digestive par vancomycine, tobramycine et colistine étaient colonisées par *P. aeruginosa*. Cette colonisation était à l'origine de signes cliniques associant fièvre, diarrhée ou épisodes récurrents d'*iléus* intestinal chez trois des quatre patients. *P. aeruginosa* disparut des selles entre une et quatre semaines après leur isolement après traitement antibiotique adapté. Les recherches environnementales furent négatives. Les selles des autres enfants hospitalisés furent analysées, la souche étant retrouvée chez deux enfants n'ayant pas reçu de décontamination digestive. Des investigations rétrospectives retrouvèrent l'isolement de la souche clonale de *P. aeruginosa* 6 mois avant la période épidémique dans les selles d'un des patients de l'épidémie, antérieurement hospitalisé. Les auteurs conclurent qu'en Hémato-oncologie, les infections systémiques à *P. aeruginosa* sont précédées d'une colonisation gastro-intestinale.

3. Facteurs de risque d'acquisition de souches résistantes

Plusieurs études ont clairement établi le rôle de l'administration d'un antibiotique dans le risque de survenue d'une résistance chez *P. aeruginosa* à ce même antibiotique. Cela est particulièrement vrai pour l'imipénème mais également pour d'autres antibiotiques. Dans une étude incluant 267 patients ayant présenté une bactériémie à *P. aeruginosa* entre 1989 et 1998, Boffi El Amari *et al.* (2001) ont montré une association (analyse univariée) entre l'exposition à la ceftazidime (OR 11,4), à la pipéracilline (OR 4,4) et à l'imipénème (OR 2,7) et l'isolement d'une souche de *P. aeruginosa* résistante à ces mêmes antibiotiques. Aucune association n'était retrouvée pour l'exposition à la ciprofloxacine et aux aminoglycosides. En analyse multivariée, la monothérapie par un antibiotique actif sur *P. aeruginosa* était associée à la résistance à cet antibiotique (OR 2,5) alors que la bithérapie ne l'était pas.

Dans une autre cohorte prospective, Carmeli *et al.* (1999) ont analysé 271 patients ayant développé une infection par *P. aeruginosa*, dont 10,2% par une souche résistante à au moins un des quatre antibiotiques étudiés (ceftazidime, pipéracilline, imipénème et ciprofloxacine). Seul l'imipénème était associé à une souche résistante à au moins un des quatre antibiotiques étudiés (Hazard ratio [HR] 2,8). Les auteurs retrouvaient une association significative entre l'exposition à l'un des quatre antibiotiques et la résistance au même antibiotique pour la piperacilline (HR 5,2), la ciprofloxacine (HR 9,2) et l'imipénème (HR 44) mais pas pour la ceftazidime. Les auteurs concluaient que le risque de sélection de la résistance variait selon les antibiotiques, avec un risque très élevé pour l'imipénème et faible pour la ceftazidime.

Une étude plus ancienne publiée en 1997 par Cailleaux *et al.* (1997) retrouvait également une association entre exposition à l'imipénème et résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* (ORa 6,7). Les patients présentant un prélèvement clinique positif à *P. aeruginosa* résistant uniquement à l'imipénème ou résistant à l'imipénème et à la ceftazidime (n=14) étaient comparés à des patients colonisés par une souche de *P. aeruginosa* sensible aux antibiotiques ou résistante à la ceftazidime (n=36). Dans cette même étude, les patients présentant un prélèvement clinique positif à *P. aeruginosa* résistant uniquement à la ceftazidime ou résistant à

l'imipénème et à la ceftazidime (n=12) étaient comparés à des patients colonisés par une souche de *P. aeruginosa* sensible aux antibiotiques ou résistante à l'imipénème (n=38). Les facteurs de risque associés à la résistance à la ceftazidime étaient la trachéotomie (OR 7,4) et l'exposition à un antibiotique à faible activité antipseudomonas comme les pénicillines, l'amoxicilline, l'oxacilline, le cefotaxime ou l'association amoxicilline-acide clavulanique (OR 4,9). Dans une autre étude cas-témoins publiée la même année (Troillet *et al.*, 1997) comparant 40 patients infectés par *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème à 387 témoins non infectés à *P. aeruginosa*, les facteurs de risque associés à la résistance à l'imipénème étaient la transplantation (OR 3,9) et l'exposition à l'imipénème (16,9). La prise d'autres antibiotiques n'influçait pas la résistance à l'imipénème.

Toutes ces études montrent donc une association causale relativement forte entre l'exposition à l'imipénème et résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* avec des OR variant de 2,7 à 44 et des intervalles de confiance parfois peu précis. La relation entre exposition à la ceftazidime et résistance à cet antibiotique est moins tranchée, l'étude de Carmeli *et al.* (1999) ne montrant pas de relation causale. Toutes ces études sont réalisées à partir de prélèvements à visée diagnostique, que le patient soit infecté ou colonisé. L'approche est souvent rétrospective, et la plupart du temps les échantillons sont de petite taille, notamment pour les cas. Les patients inclus sont souvent hospitalisés en réanimation ou unité de soins intensifs mais pas seulement. Il est donc difficile de comparer ces études car l'interprétation de la relation causale (valeur de l'estimation de l'OR et de son intervalle de confiance) dépend étroitement de la méthodologie utilisée et du choix des témoins. Par ailleurs, certaines associations ne sont testées qu'en analyse univariée et ne prennent pas en compte les facteurs de confusion ou certaines interactions. De plus, ces études ne prennent pas en compte l'impact écologique sur la flore intestinale de l'exposition aux antibiotiques. Ainsi, certains témoins « non infectés ou colonisés » inclus à partir des prélèvements à visée diagnostique peuvent avoir une modification de leur flore intestinale sous antibiothérapie autre qu'à visée antipseudomonas et être colonisés par *P. aeruginosa*. De même, la part de la résistance bactérienne due à la transmission croisée n'est pratiquement jamais abordée, et certains patients sont infectés ou colonisés par une souche résistante alors qu'ils n'ont jamais été exposés à l'antibiotique étudié. Enfin, le délai d'apparition de la souche résistante par rapport

à la prise d'antibiotiques est peu souvent pris en compte, les méthodes d'analyse multivariée utilisant ainsi souvent la régression logistique binaire alors que les modèles de survie et les modèles de Cox seraient plus adaptés à ce type de données.

Harris *et al.* ont publié deux articles en 2001 et 2002 dans la revue *Clinical Infectious Diseases* et abordent les différents aspects méthodologiques des études cas-témoins et l'importance de la sélection des témoins, notamment dans l'analyse de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. La première publication a analysé 406 études mais seulement 37 présentaient les critères d'inclusion et d'exclusion que s'étaient fixés les auteurs (étude de type cas-témoins, analyse d'antibiotiques ou de famille d'antibiotiques, analyse statistique comparative avec recherche de facteurs de risque, études réalisées chez l'homme et publiées en langue anglaise). Seulement 13 études avaient sélectionné des témoins adaptés, et 11 pris en compte le délai d'exposition aux antibiotiques. Vingt sept avaient inclus d'autres facteurs dans l'analyse des facteurs de risque. Pour cinq de ces études, la bactérie analysée était *P. aeruginosa* (Krcmery *et al.*, 1996 ; Muder *et al.*, 1997 ; Troillet *et al.*, 1997 ; Cailleaux *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1999). Deux de ces études sont décrites ci-dessus. Parmi les trois autres études, celle de Muder comparait des patients infectés/colonisés par *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (pipéracilline, ceftazidime, imipénème et ciprofloxacine) (n=24). La durée totale d'antibiothérapie était le seul facteur de risque associé à la multirésistance chez *P. aeruginosa*. Les auteurs ne trouvaient pas d'association significative par type d'antibiotique mais 11 patients étaient porteurs d'une même souche clonale multirésistante. L'étude de Kcmery comparait au sein d'une cohorte de 101 patients immunodéprimés ayant présenté une bactériémie, ceux infectés par une souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème (n=91) à ceux infectés par une souche sensible (n=10) sur une période de 6 ans. L'exposition antérieure à l'amikacine, les céphalosporines de 3^e génération, l'imipénème et les fluoroquinolones était significativement associée à la résistance à l'imipénème. Suivant la même méthodologie, l'étude de Lee comparait au sein d'une cohorte prospective de 97 patients ayant présenté une infection à *P. aeruginosa*, ceux infectés par une souche résistante à la ceftazidime (n=35) à ceux infectés par une souche sensible à la ceftazidime (n=62). Par régression logistique binaire, l'exposition aux céphalosporines de 1^{ère} (OR 3,4) et de 3^e génération (OR=

3,1) et à un moindre degré à la pipéracilline (OR 2,9) était significativement associée à la résistance à la ceftazidime.

L'autre étude de Harris *et al.* (2002) illustre l'importance du choix des témoins dans l'interprétation des résultats dans l'étude des facteurs de risque de la résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa*, la résistance à la vancomycine chez les entérocoques et la résistance à l'association ampicilline-sulbactam chez *E. coli*. La partie sur la résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* a été plus largement développée dans une troisième publication dans la même revue scientifique (Harris *et al.*, 2002). Deux groupes de cas 1) patients porteurs de *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème (IRPA) et 2) patients porteurs de *P. aeruginosa* sensible à l'imipénème (ISPA) à partir de prélèvements cliniques, étaient comparés à des groupes témoins; 120 IRPA et 662 ISPA ont été analysés et comparés respectivement à 770 et 746 témoins sur une période de deux ans et demi. Par analyse multivariée, les patients porteurs d'IRPA étaient significativement plus exposés que les témoins dans les 14 jours précédant aux antibiotiques suivants: imipénème (OR, 4,96, 95%IC, 2,88-8,57), pipéracilline-tazobactam (OR, 2,39, 95%IC, 1,42-4,03), vancomycine (OR, 1,80, 95%IC, 1,09-2,96) et aminoglycosides (OR, 2,19, 95%IC, 1,35-3,56). Les autres facteurs de risque indépendants identifiés étaient le délai de séjour jusqu'à la positivité du prélèvement et un séjour antérieur en réanimation. Les patients porteurs d'ISPA étaient significativement plus exposés aux antibiotiques suivants: vancomycine (OR, 1,64, 95%IC, 1,20-2,26), ampicilline-sulbactam (OR, 2,00, 95%IC, 1,38-2,89) et céphalosporines de 2^{ème} génération (OR, 2,00, 95%IC, 1,30-3,06). Dans ce cas, les autres facteurs de risque indépendants étaient l'âge et un séjour antérieur en réanimation. Les auteurs soulevaient le rôle joué par l'exposition à l'imipénème dans la survenue d'infection nosocomiale causée par *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème, mais précisait que d'autres facteurs devaient également être pris en compte dans l'évaluation et le contrôle de ce risque.

Depuis, une autre étude cas-témoins d'importance majeure a été publiée (Zavaski *et al.*, 2005) avec une approche méthodologique différente puisque les patients porteurs d'IRPA étaient dans un premier temps comparés à des témoins tirés au sort, et dans un deuxième temps comparés à des patients porteurs d'ISPA. Ainsi 93 patients porteurs d'IRPA furent comparés à 93 contrôles puis à 65 patients porteurs

d'ISPA. Dans la première comparaison, les facteurs de risque indépendants étaient l'exposition aux carbapénèmes (OR, 5,82, $_{95\%}$ IC, 2,41-4,07), la ventilation mécanique (OR, 3,22, $_{95\%}$ IC, 1,52-6,83), et une hospitalisation dans l'année précédente (OR, 2,59, $_{95\%}$ IC, 1,20-5,56). Dans la deuxième comparaison, les facteurs indépendants associés à l'isolement d'une souche résistante à l'imipénème étaient l'exposition aux carbapénèmes (OR, 12,82, $_{95\%}$ IC, 3,99-41,23) et l'insuffisance rénale (OR, 5,00, $_{95\%}$ IC, 1,28-19,53). Les auteurs relevaient le rôle de l'exposition aux carbapénèmes et la majoration du risque par la prise concomitante de vancomycine.

Dans d'autres études, l'exposition aux fluoroquinolones était identifiée comme facteur de risque d'acquisition d'infections causées par *P. aeruginosa* multirésistant aux antibiotiques (résistant à au moins trois des antibiotiques suivants, ceftazidime, piperacilline, imipénème, ciprofloxacine, gentamicine et amikacine), que les cas soient comparés à des contrôles ou à des patients porteurs de *P. aeruginosa* sans multirésistance acquise (Richard *et al.*, 2001, Defez *et al.* 2004).

Dans leur étude, Richard *et al.* ont déterminé les facteurs de risque de colonisation gastro-intestinale par des bacilles à Gram négatif résistants aux fluoroquinolones (dont *P. aeruginosa*) chez des patients hospitalisés. Pour les patients colonisés par une souche résistante à l'admission, l'exposition dans le dernier mois aux fluoroquinolones était un facteur de risque indépendant (RR=2,2, $_{95\%}$ IC, 1,1-4,6). Pour les patients dont le portage digestif d'une souche résistante aux fluoroquinolones était détecté pendant l'hospitalisation (avec un prélèvement négatif antérieur), l'exposition aux fluoroquinolones était identifiée comme facteur de risque uniquement chez les patients n'ayant pas reçu de fluoroquinolones dans le mois précédant l'hospitalisation (RR=2,9, $_{95\%}$ IC, 1,4-6,0).

RECHERCHE EPIDEMIOLOGIQUE

Nature et objectifs des recherches

Nos travaux de recherche, réalisés au cours des dix dernières années, ont essentiellement concerné l'étude des facteurs de risque de colonisation ou d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Nous nous sommes intéressés à différents facteurs de risque, notamment le rôle de l'exposition aux antibiotiques, mais aussi d'autres facteurs liés à l'hôte (immunodépression) ou à l'hospitalisation (durée de séjour, type de service, actes invasifs). Nos recherches s'appuyaient sur l'hypothèse que l'émergence et la diffusion des bactéries résistantes aux antibiotiques en milieu hospitalier résultent très probablement de l'association de plusieurs facteurs comme la concentration élevée de malades à haut risque infectieux bénéficiant de procédures invasives, l'immunodépression, la présence de nombreux patients colonisés ou infectés hospitalisés dans des services à risque infectieux, sources de dissémination des bactéries résistantes et l'utilisation très fréquente et parfois inadaptée d'antibiotiques.

Ces travaux se sont inscrits dans la continuité d'études antérieures réalisées dans le laboratoire de Bactériologie-Virologie et Hygiène Hospitalière du CHU de NANTES (Richard *et al.*, 1994, Villers *et al.*, 1998). Nous avons ciblé nos recherches sur les bacilles à Gram négatif, et réalisé plusieurs études épidémiologiques sur deux périodes. La première période (1996-1999) comprenait une analyse des facteurs de risque d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques à partir de souches isolées de prélèvement à visée diagnostique. La résistance chez *Escherichia coli* a été retenue comme modèle compte tenu de la fréquence d'isolement de cette bactérie dans les laboratoires de microbiologie et de son pouvoir pathogène. Pendant la seconde période (1999-2005), nous avons analysé l'impact de l'antibiothérapie mais aussi d'autres facteurs liés à l'hôte ou à l'hospitalisation sur la colonisation de la flore intestinale par des entérobactéries et par *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux antibiotiques dans différents groupes de patients hospitalisés.

Notre travail de thèse a donc débuté par l'étude de l'incidence de la résistance et des facteurs de risque d'infections causées par *Escherichia coli* résistant aux

antibiotiques au sein d'une cohorte de patients hospitalisés (**article 1**).

La mise en évidence du rôle de l'antibiothérapie dans la survenue d'infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques est d'interprétation délicate. La relation entre l'exposition à un antibiotique donné ou à une classe d'antibiotiques donnée et l'émergence de résistance au sein d'une espèce bactérienne au même antibiotique est beaucoup plus pertinente. Nous avons donc sélectionné 44 souches d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération. L'étude bactériologique de ces souches a permis de caractériser les mécanismes de résistances. L'approche épidémiologique de 20 souches, comprenant deux études cas-témoins, a évalué les facteurs de risque d'acquisition de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération, en particulier le rôle joué par l'administration de β -lactamines. Ces travaux sont présentés dans l'**article 2**.

Dans une deuxième phase et à partir des constats issus des deux premières études, nous avons orienté nos travaux vers l'étude, d'une part, de l'incidence du portage digestif de bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques à l'admission et en cours d'hospitalisation, et d'autre part des facteurs de risque associés à ce portage digestif, dans des groupes différents de patients hospitalisés. Nous avons étudié dans un premier temps, l'incidence et les facteurs de risque de colonisation par des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération et aux fluoroquinolones. Ces travaux sont présentés dans l'**article 3**. Dans un deuxième temps, nous avons évalué le rôle de l'antibiothérapie et de l'hospitalisation sur la colonisation digestive par *Pseudomonas aeruginosa*. Ces travaux sont présentés dans l'**article 4**.

Nous avons ensuite étudié la relation entre la colonisation digestive par *P. aeruginosa* et infection par cette même bactérie chez des patients hospitalisés en réanimation. Ces travaux seront soumis à publication prochainement et sont présentés en fin de chapitre.

A. Etude des facteurs de risque d'infections causées par *Escherichia coli* résistant aux antibiotiques

1. Introduction

Cet article publié dans *Clinical Infectious Disease* en 1999 présentait les résultats d'une étude réalisée en 1996 sur une période de trois mois. Il s'agissait de la première étape de notre travail de recherche sur des souches cliniques de patients hospitalisés au CHU de Nantes. Le choix de l'étude de *E. coli* a été fait compte tenu de l'implication très fréquente de ce pathogène dans les infections communautaires et nosocomiales. Il s'agissait d'une cohorte prospective de 407 patients hospitalisés au CHU de Nantes et présentant un prélèvement positif à *E. coli*. L'objectif principal de cette étude était de déterminer les facteurs de risque d'infections par une souche résistante à au moins un antibiotique, notamment l'impact de l'exposition antérieure aux antibiotiques. L'objectif secondaire était de déterminer l'incidence de la résistance par antibiotique et par service.

2. Présentation de l'article 1

Escherichia coli: epidemiology and analysis of risk factors for infections caused by resistant strains.

Lepelletier Didier, Caroff Nathalie, Reynaud Alain, Richet Hervé. *Clin Infect Dis* 1999;29:548-52.

3. Commentaires

Au moment de leur publication, les résultats de cette étude confirmaient le rôle de l'antibiothérapie antérieure sur la résistance chez *E. coli* isolé de souches cliniques. Elle concernait une cohorte importante de patients hospitalisés à l'échelle d'un hôpital. L'immunodépression apparaissait également associée à la résistance. Cependant, l'étude des facteurs de risque n'évaluait que la résistance à au moins un antibiotique et pas un antibiotique ou une famille d'antibiotique en particulier et seules les méthodes d'analyse univariée avaient été utilisées. Les résultats globaux d'analyse de facteurs de risque étaient ensuite complétés par la mise en évidence d'une relation significative forte entre l'exposition aux fluoroquinolones, aux β -lactamines et au cotrimoxazole et les infections causées par *E. coli* résistant à ces antibiotiques. Nous avons également construit un score de risque associant l'antibiothérapie antérieure et l'immunodépression dans une analyse par χ^2 de tendance, même si cette méthode est généralement réservée aux variables continues.

Au-delà de l'analyse des facteurs de risque, cette étude apportait des informations pertinentes sur l'incidence de la résistance aux antibiotiques. La résistance d'*E. coli* à divers antibiotiques testés était plus élevée lorsque l'infection était acquise à l'hôpital (n=130/407), sans toutefois observer de différence significative (**Figure 19**). Vingt sept services différents étaient inclus dans l'étude et la résistance à certains antibiotiques variait selon les services. Par exemple, la résistance au cotrimoxazole variait de 0% en pédiatrie à 30% en Urologie et Immuno-néphrologie, alors que le taux de résistance moyen, quel que soit le service, était de 15%. Ces observations nous conduisaient à ne plus recommander aux prescripteurs de notre établissement, le cotrimoxazole dans le traitement empirique des infections urinaires basses. Par ailleurs, le taux de résistance à la ciprofloxacine était de 3,5%, que les souches soient communautaires ou hospitalières. Si les taux de résistance aux β -lactamines n'ont pas varié depuis une dizaine d'années, la résistance d'*E. coli* aux fluoroquinolones a augmenté de manière significative, notamment pour les souches hospitalières, passant de moins de 1% en 1989 à près de 10% en 2000 (**Figure 20**, d'après Lautenbach *et al.*, 2004).

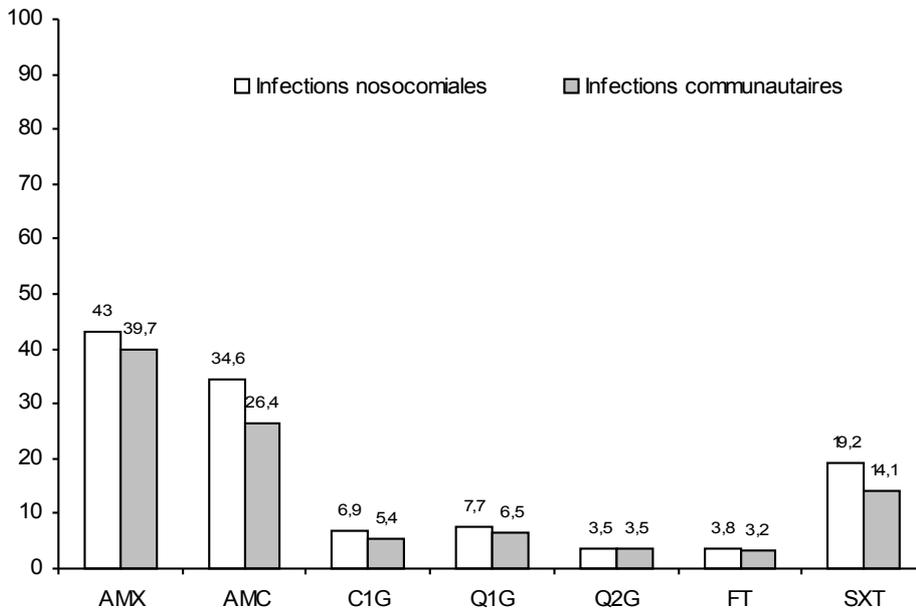


Figure 19. Résistance aux antibiotiques de *E. coli* à divers antibiotiques testés en fonction de l'origine de l'infection (AMX: amoxicilline, AMC: amoxicilline-acide clavulanique, C1G: céphalosporines de 1^{ère} génération, QG: quinolones de 1^{ère} génération, C2G: fluoroquinolones, FT: nitrofurane, SXT: cotrimoxazole).

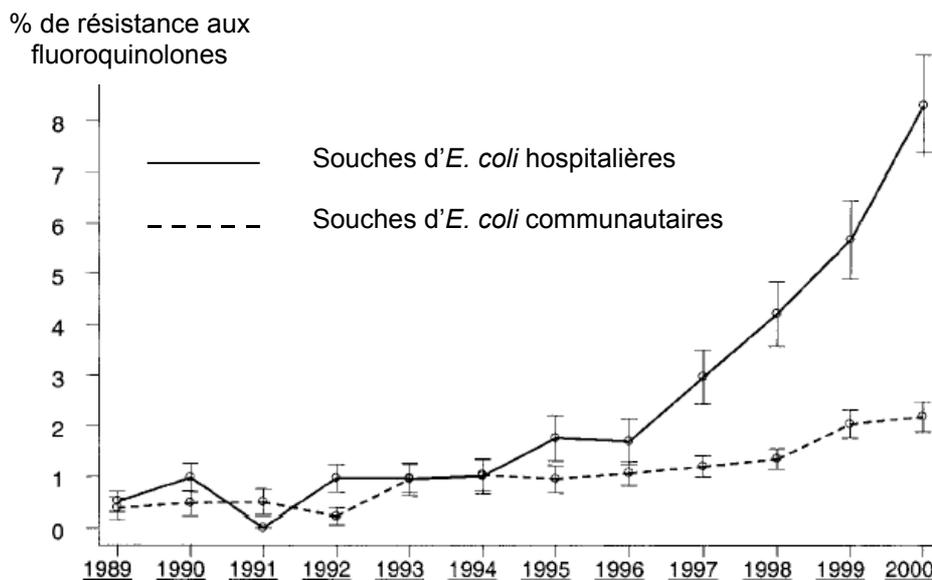


Figure 20. Evolution de la résistance aux fluoroquinolones de souches de *E. coli* communautaires et hospitalières, 1989-2000 (d'après Lautenbach *et al.*, 2004). Les barres verticales indiquent les intervalles de confiance à 95%.

Par contre, depuis la publication de cette étude, le taux de résistance des souches de *E. coli* aux β -lactamines est resté relativement stable pendant de nombreuses années, aussi bien en milieu hospitalier qu'en ville. L'actualisation régulière des statistiques de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries hospitalières permet de mettre à la disposition des bactériologistes et surtout des cliniciens des données utiles pour leur pratique quotidienne en améliorant le caractère probabiliste des antibiothérapies empiriques (Nijssen *et al.*, 2004, Bhavnani *et al.*, 2006). D'après les dernières données du programme de surveillance de la résistance SENTRY, environ 50% des souches d'*E. coli* sont résistantes à l'ampicilline, 47% résistantes à la ticarcilline, 20 à 25 % à l'amoxicilline-acide clavulanique. Moins de 2% des souches sont résistantes à la ceftazime et la résistance à l'imipénème n'est pas observée (Nijssen *et al.*, 2004). Cependant, la diffusion de souches productrices de β -lactamases à spectre élargi représente certainement un enjeu pour les années à venir (Bhavnani *et al.*, 2006).

B. Etude bactériologique et épidémiologique de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération chez *Escherichia coli*

1. Introduction

Comme nous l'a montré l'étude précédente, la résistance chez *E. coli* aux céphalosporines de 3^{ème} génération est faible (<2%). Ce taux de résistance n'a pas varié depuis des années même si l'émergence de souches productrices de β LSE dans la communauté représente en enjeu pour les années futures et risque de faire évoluer les taux de résistance.

Cette seconde étude avait pour objectif principal d'identifier les mécanismes de résistance de *E. coli* aux céphalosporines de 3^{ème} génération, mais aussi d'évaluer l'impact de l'exposition aux β -lactamines sur l'émergence de cette résistance.

2. Présentation de l'article 2

Bacterial and epidemiological study of the resistance to third-generation cephalosporins in *Escherichia coli* in a French hospital.

Nathalie Caroff, Didier Lepelletier, Jean-luc Orsonneau, Annie Blin, Roger Labia, Hervé Richet, Alain Reynaud. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:37-46.

3. Commentaires

Cette étude a permis l'évaluation, d'une part, des mécanismes de résistance de 44 souches d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et, d'autre part, l'évaluation de l'impact de l'exposition antérieure aux antibiotiques, notamment les β -lactamines.

Cette étude faisait suite à l'article 1 présenté dans le chapitre précédent, où le critère de jugement était la résistance à au moins un antibiotique. L'analyse univariée incluant l'exposition aux antibiotiques mais aussi d'autres facteurs dans l'article 1 ne testait donc pas la résistance à un antibiotique ou à un phénotype de résistance particulier, mais la résistance à au moins un antibiotique quel qu'il soit.

Il nous a donc paru ainsi intéressant et original dans cette deuxième étude, d'analyser les facteurs de risque d'infections par une souche de *E. coli* résistante aux C3G en utilisant une étude de type cas-témoins, sélectionnant deux groupes de témoins différents. Un premier groupe témoin était constitué de patients infectés par des souches de *E. coli* sensibles à l'ensemble des antibiotiques, et un second groupe témoin était constitué de patients infectés par des souches présentant un phénotype de résistance de type «pénicillinase» (résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline). Cette stratégie d'analyse n'a pas permis de déterminer un facteur de risque spécifique lié à l'hôte ou à l'hospitalisation dans chacune des deux comparaisons, l'exposition antérieure aux antibiotiques quels qu'ils soient étant significativement associée à la résistance aux C3G dans les deux groupes, avec cependant un OR plus élevé dans le premier groupe témoin (OR 6) par rapport au second groupe témoin (OR 3,5). Par contre, l'exposition antérieure aux β -lactamines apparaissait logiquement associée significativement à la résistance aux C3G uniquement dans la première comparaison (OR 4,5). Le risque de résistance aux C3G sous exposition antérieure à un antibiotique paraissait donc plus important lorsque les témoins étaient infectés par une souche sensible. Ces résultats ne prenaient pas en compte la durée d'exposition et n'ont pas été validés par analyse multivariée adaptée au moment de la publication en 1999. Ils ne permettaient donc pas d'interpréter de manière plus précise les différences des valeurs des estimations des OR observés entre les deux groupes.

Par ailleurs, seulement 3 des 44 (6,8%) souches étaient résistantes par production de β LSE. Le mécanisme prépondérant de la résistance aux C3G des souches de *E. coli* étudiées était l'hyperproduction de céphalosporinase AmpC.

Depuis cette étude, l'épidémiologie de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération a évolué puisque la proportion d'entérobactéries productrices de β LSE parmi les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération isolées au CHU de Nantes est passée de 10% (6/59) en 2004 (sur 4 mois) à 16,4% (30/183) en 2005 (sur un an) et à 26,4% (14/53) en 2006 (1^{er} trimestre). La proportion d'*E. coli* producteur de β LSE au sein des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération est passée de 17% (1/6) en 2004 à 60% (18/30) en 2005 et à 86% (12/14) en 2006.

Des études épidémiologiques récentes ont identifié l'impact de l'antibiothérapie dans l'émergence de souches de *E. coli* productrices de β LSE, que les souches soient communautaires (Calbo *et al.*, 2006) ou hospitalières (Pena *et al.*, 2006).

C. Etude des facteurs de risque de colonisation gastro-intestinale par des bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques

1. Présentation générale de l'étude

L'administration d'antibiotiques a souvent été mise en relation avec la survenue d'infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Mais avant d'avoir un impact visible en terme d'infection, l'antibiothérapie constitue l'un des principaux facteurs d'agressions vis-à-vis de la flore intestinale. Elle modifie l'écosystème bactérien, en altérant d'abord la flore de barrière. La disparition de cet effet de barrière peut entraîner l'émergence de bactéries appartenant à la flore sous-dominante telles que les entérobactéries ou *Pseudomonas aeruginosa*.

Afin de mieux comprendre l'impact de l'antibiothérapie sur la flore intestinale, nous avons réalisé une étude prospective analysant une cohorte de 933 patients hospitalisés entre 2000 et 2002 dans cinq services différents du CHU de Nantes, dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC). L'objectif de cette étude était d'évaluer le rôle de l'antibiothérapie mais aussi d'autres facteurs liés à l'hôte ou au séjour hospitalier sur le risque de colonisation digestive par des bactéries résistantes aux antibiotiques chez des patients hospitalisés dans des services au recrutement différent, avec des politiques d'antibiothérapies différentes.

Nous avons en particulier étudié l'épidémiologie et les facteurs de risque de la colonisation digestive par des souches d'entérobactéries résistantes à la ceftazidime et aux fluoroquinolones (**article 3**). Sur la même cohorte de patients, nous avons également étudié l'épidémiologie et les facteurs de risque de colonisation digestive par *Pseudomonas aeruginosa* (**article 4**). Enfin, dans un troisième temps, nous avons étudié la diffusion clonale de *P. aeruginosa* au sein des services de réanimation, et évaluer la relation colonisation-infection causée par la même souche de *P. aeruginosa* (**résultats non encore soumis à publication**).

2. Matériel et méthode

2.1 Etude clinique

Du fait des différences importantes existant entre les populations de patients étudiées et de l'impossibilité de mener en parallèle la surveillance continue dans les cinq services, les patients ont été inclus de façon séquentielle et non pas simultanée. Afin d'obtenir des groupes de patients homogènes, environ 200 patients ont été inclus dans chacun des services participants (sauf en Réanimation Médicale où seulement 105 patients ont été inclus).

Tableau X. Caractéristiques des 5 services du CHU de Nantes

Services	Nombre annuel		Période d'étude	Inclusions
	d'admissions	de journées		
Réanimation chirurgicale (12 lits)	800	4300	04/2000-03/2001	199
Réanimation Médicale (20 lits)	800	6300	03/2001-06/2001	105
Urologie (40 lits)	1000	6000	06/2001-10/2001	212
Médecine Polyvalente-Urgences (23 lits)	1500	8500	10/2001-01/2002	218
Soins de Suite et RF (80 lits)	1000	38000	12/2001-03/2002	199

2.2 Etude bactériologique

Un écouvillonnage rectal a été effectué chez les patients lors de l'admission puis au 3^{ème} jour d'hospitalisation, une fois par semaine et le jour de la sortie, ce qui représente un minimum de trois prélèvements par patient. Les patients hospitalisés moins de 48 heures étaient secondairement exclus de l'étude. L'ensemble de la méthode utilisée dans le traitement des écouvillons rectaux est décrit ci-dessous car il n'a pas pu être entièrement développé dans les articles 3 et 4.

Recueil et acheminement des échantillons

L'analyse de flore a été effectuée à partir d'échantillons recueillis par écouvillonnage rectal, acheminés au laboratoire dans un délai maximal de 1 heure, afin d'éviter la dessiccation.

Traitement initial et conservation des échantillons

Chaque écouvillon a été déchargé dans 2 mL d'eau distillée stérile, par passage au Vortex pendant 30 secondes et la suspension bactérienne ainsi obtenue a été alors congelée à -20°C .

Culture

Après décongélation et homogénéisation par passage au Vortex, des suspensions bactériennes préparées à partir des écouvillonnages rectaux, l'ensemencement sur milieu de culture a été réalisé selon le protocole ci-après:

Isolement sur gélose lactosée au bromocrésol pourpre (BCP):

- de 10 μL de la suspension bactérienne initiale par la méthode des quadrants, à l'aide d'une anse calibrée;

- de 100 μL d'une dilution au 1/100 de la suspension initiale, par étalement au râteau.

Après 24 heures d'incubation à 37°C en atmosphère ordinaire, on a évalué la présence des groupes bactériens suivants, en fonction des caractéristiques indiquées:

- Entérocoques:

. morphologie macroscopique et microscopique		directement à partir des colonies bactériennes
. recherche de la catalase		

- *Pseudomonas* sp.:

. morphologie macroscopique et microscopique		directement à partir des colonies bactériennes
. recherche de l'oxydase		
. typage antigénique des <i>P. aeruginosa</i> , par agglutination sur lame, après repiquage de colonie sur tube de gélose trypticase-soja (TS).		

- Entérobactéries, subdivisées en 4 groupes principaux: groupe K.E.S. (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*), groupe P.P.M. (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*), groupe S.S. (*Salmonella*, *Shigella*), et *Escherichia coli*, sur la base des critères suivants:

. morphologie macroscopique et microscopique		directement à partir des colonies bactériennes
. recherche de l'oxydase		

. galerie d'orientation diagnostique biochimique, après repiquage des colonies sur tube de gélose TS:

- * recherche de la β -galactosidase (test ONPG);
- * recherche de la tryptophane-désaminase (test TDA);
- * recherche de la production d'acétoïne (test VP);
- * recherche de la production d'indole.

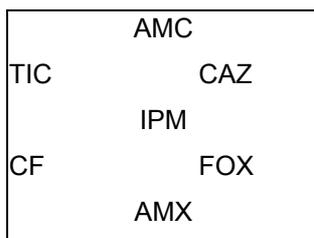
Ensemencement sur milieux sélectifs, par étalement au râteau, de 100 μ L de suspension bactérienne initiale

- gélose BCP + 8 mg/L d'amoxicilline (AMX) + 32 mg/L de vancomycine (VA), pour la recherche de *E. coli* résistants aux aminopénicillines;
- gélose BCP + 8 mg/L de ceftazidime (CAZ) + 32 mg/L de VA, pour la recherche de *E. coli* et *P. aeruginosa* résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération;
- gélose BCP + 8 mg/L d'imipénème (IPM) + 32 mg/L de VA, pour la recherche de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes;
- gélose BCP + 2 mg/L d'ofloxacine (OFX) + 32 mg/L de VA, pour la recherche de *E. coli* et *P. aeruginosa* résistants aux quinolones;
- gélose bile-esculine + 10 mg/L de VA, pour la recherche d'entérocoques résistants aux glycopeptides.

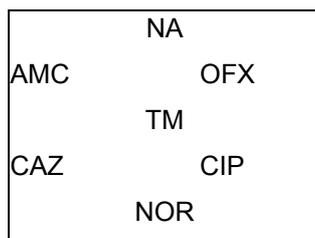
Caractérisation des souches résistantes

Les colonies de souches résistantes isolées sur milieux sélectifs ont été repiquées sur tube de gélose TS, pour étude complémentaire incluant:

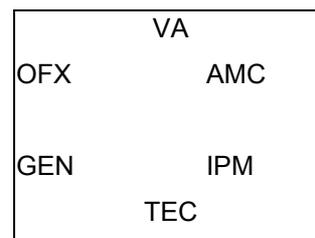
- Orientation diagnostique selon les caractéristiques précédemment indiquées, complétées, pour les entérocoques, de la recherche de la pyrrolidonyl-arylamidase (PYR) et d'une galerie d'identification biochimique rapid ID 32 STREP® (bioMérieux) en cas de positivité de cette recherche.
- Etude du comportement vis-à-vis des antibiotiques par méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton (MH) en présence de disques d'antibiotiques (Sanofi Diagnostics Pasteur), selon les schémas suivants (lecture en 24 heures):



E. coli et *P. aeruginosa*
résistants aux β -lactamines



E. coli et *P. aeruginosa*
résistants à l'ofloxacine



Entérocoques résistants
à la vancomycine

AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, TIC : ticarcilline, CF : céfalotine, FOX : céfoxitine, IPM : imipénème, OX : oxacilline, NA : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, NOR : norfloxacine, TM : tobramycine, GEN : gentamicine forte charge, TEC : teicoplanine.

- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) d'antibiotiques, par méthode de dilution en gélose MH afin de déterminer le phénotype et préciser le niveau de résistance aux β -lactamines et de fluoroquinolones des souches de *E. coli* et *P. aeruginosa* et celles des glycopeptides pour les entérocoques.

2.3 Analyse statistique

Trois fichiers informatiques de recueil des données ont été créés pour cette étude à l'aide du logiciel Epi Info (version 6.04b, Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Géorgie, USA). Le premier fichier correspondait aux données relatives à l'analyse bactériologique des 3713 écouvillons rectaux réalisés. Le deuxième fichier correspondait aux données relatives aux caractéristiques démographiques, cliniques et thérapeutiques des 933 patients inclus dans l'étude. Le troisième fichier correspondait aux données relatives aux infections présentées par les 933 patients. L'ensemble des données a été recueilli entre avril 2000 et juillet 2002 puis ensuite saisi sur les fichiers informatiques au cours de l'année 2003. Pour l'analyse des résultats, les 3 fichiers ont été fusionnés par une variable commune d'identification. Pour éviter les doublons, les fichiers ont été analysés en stratifiant les données par l'espèce bactérienne étudiée, un patient pouvant être colonisé par plusieurs bactéries résistantes. Ainsi le fichier final comprenait 1079 fiches pour 933 patients.

L'analyse descriptive et univariée a été réalisée à l'aide du logiciel Epi Info, utilisant le test du χ^2 ou le test exact de Fisher pour les variables binaires et le test F (analyse de variance) pour les variables continues. Un seuil de significativité de 5% a été retenu.

Pour l'analyse multivariée, les fichiers Epi Info ont été transformés en fichiers de type Dbase® puis en fichiers de type Excel®. Ces fichiers ont ensuite été analysés à l'aide des logiciels d'analyse statistique SYSTAT® (version 7, 1997, Richmond, Californie, USA) et SPSS® (version 10, 2000, Chicago, Illinois, USA). Nous avons construit des modèles de régression logistique par méthodes ascendante ou descendante conditionnelle, en incluant les variables dont les seuils de significativité étaient inférieurs à 0,25 en analyse univariée. L'adéquation des modèles finaux a été mesurée par le test d'Hosmer et Lemeshow. Des modèles de régression logistique binaire ont été construits pour l'analyse des facteurs de risque de colonisation digestive par des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération et aux fluoroquinolones et par *P. aeruginosa*, lorsque la variable à expliquer (critère de jugement) était dichotomique, de type « patient colonisé oui/non ». Ensuite, des courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier ont été réalisées en prenant en compte le délai de colonisation et en spécifiant l'état de colonisation à *P. aeruginosa* (1 = événement et 0 = non événement) en excluant les patients détectés colonisés à *P. aeruginosa* à l'admission. Pour les patients ayant acquis leur colonisation digestive à *P. aeruginosa* pendant l'hospitalisation, nous avons fait varier certains critères comme l'hospitalisation en réanimation ou l'exposition aux antibiotiques. Ces courbes de survie sont exprimées en survie cumulée (0 à 1), et présentées graphiquement en marches d'escalier (la période de suivi est découpée en intervalles dont les bornes sont les dates où la colonisation apparaît). Au sein de chaque intervalle, le risque est constant ainsi que le taux de survie. Nous avons ensuite construit un modèle de Cox appliqué à ces données de survie, pour estimer le coefficient de la variable « colonisation à *P. aeruginosa* », le risque relatif représentant le risque instantané de colonisation de la flore digestive. Tous ces résultats ont été assortis d'intervalles de confiance.

3. Résultats principaux

Une partie des résultats, issus de cette étude prospective, mais non intégrés dans les articles 3 et 4 sont présentés ci-dessous.

Données démographiques des patients

Les caractéristiques des patients en fonction du service d'hospitalisation sont décrites dans le **tableau XI**. L'âge moyen était de 61±20 ans et variait de 53±20 ans en Réanimation chirurgicale à 73±16 ans en Médecine Polyvalente-Urgences.

Cinquante six pour cent des patients étaient de sexe masculin, avec un sexe ratio atteignant 70% en Réanimation chirurgicale. Les femmes étaient significativement plus âgées que les hommes (65±19 ans *versus* 58±19 ans, $P<0,00001$). Onze pour cent des patients étaient immunodéprimés, proportion variant de 7% en Soins de Suite à 23% en Réanimation Médicale. Parmi les 11 patients greffés, 8 étaient hospitalisés en Urologie. Environ un patient sur deux avait un antécédent d'hospitalisation dans l'année, sauf en Soins de Suite où plus de 90% des patients avaient un antécédent d'hospitalisation dans l'année ou provenaient d'autres services du CHU de Nantes ou d'un autre établissement de santé.

Tableau XI. Caractéristiques des 933 patients inclus dans 5 services différents du CHU de Nantes entre avril 2000 et mars 2002.

Variables	Services					Total
	1	2	3	4	5	
Nombre de patients inclus	105	199	212	218	199	933
Age moyen (an)	54	53	60	73	62	61
Sexe masculin	58%	70%	67%	39%	47%	56%
Immunodépression	23%	9%	12%	11%	7%	11%
Troubles respiratoires chroniques	10%	9.5%	5%	7%	2%	6%
Diabète	11%	11%	11%	16%	10%	12%
Dialyse	14%	1%	4%	0%	1%	3%
Cancers	18%	25%	37%	11%	7%	20%
ATCD de chirurgie (<1 mois)	34%	87%	85%	3%	73%	58%
ATCD d'hospitalisation (<1 an)	43%	46%	47%	43%	94%	55%
Transfert depuis un autre service	42%	45%	3%	14%	91%	38%
Durée moyenne de séjour (jour)	15.1	12.2	7.8	7.9	32.5	14.9
Nb. moyen procédures invasives	5.3	6.3	1.5	0.3	0.1	2.4

1: réanimation médicale polyvalente; 2: réanimation chirurgicale; 3: urologie; 4: médecine polyvalente-urgence; 5: soins de suite et rééducation fonctionnelle.

Le nombre moyen de journées d'hospitalisation dans l'année était de 9±25 jours, variant de 7±15 jours en Urologie à 12±25 jours en Médecine Polyvalente-Urgences.

Le nombre moyen de procédures invasives réalisées variait de 0,1% en Soins de Suite à 6,3% en Réanimation Chirurgicale. En particulier, 56% des patients étaient porteurs d'une sonde urinaire, proportion variant de 6% en Soins de Suite à plus de 95% en Réanimations. De même, 30% des patients étaient porteurs d'un cathéter veineux central, dont 91% chez des patients de Réanimation.

Données relatives à l'antibiothérapie

Antibioprophylaxie chirurgicale

Parmi les 933 patients inclus, 386 (41%) ont reçu une antibioprophylaxie chirurgicale. Les patients hospitalisés en Réanimation Chirurgicale et en Soins de Suite avaient reçu le plus souvent une antibioprophylaxie chirurgicale (68% et 61% respectivement).

Les principales molécules prescrites étaient le céfuroxime et l'amoxicilline + acide clavulanique (**Figure 22**). En Réanimation Chirurgicale, un patient sur deux ayant bénéficié d'une antibioprophylaxie chirurgicale avait reçu l'association amoxicilline + acide clavulanique (69/136).

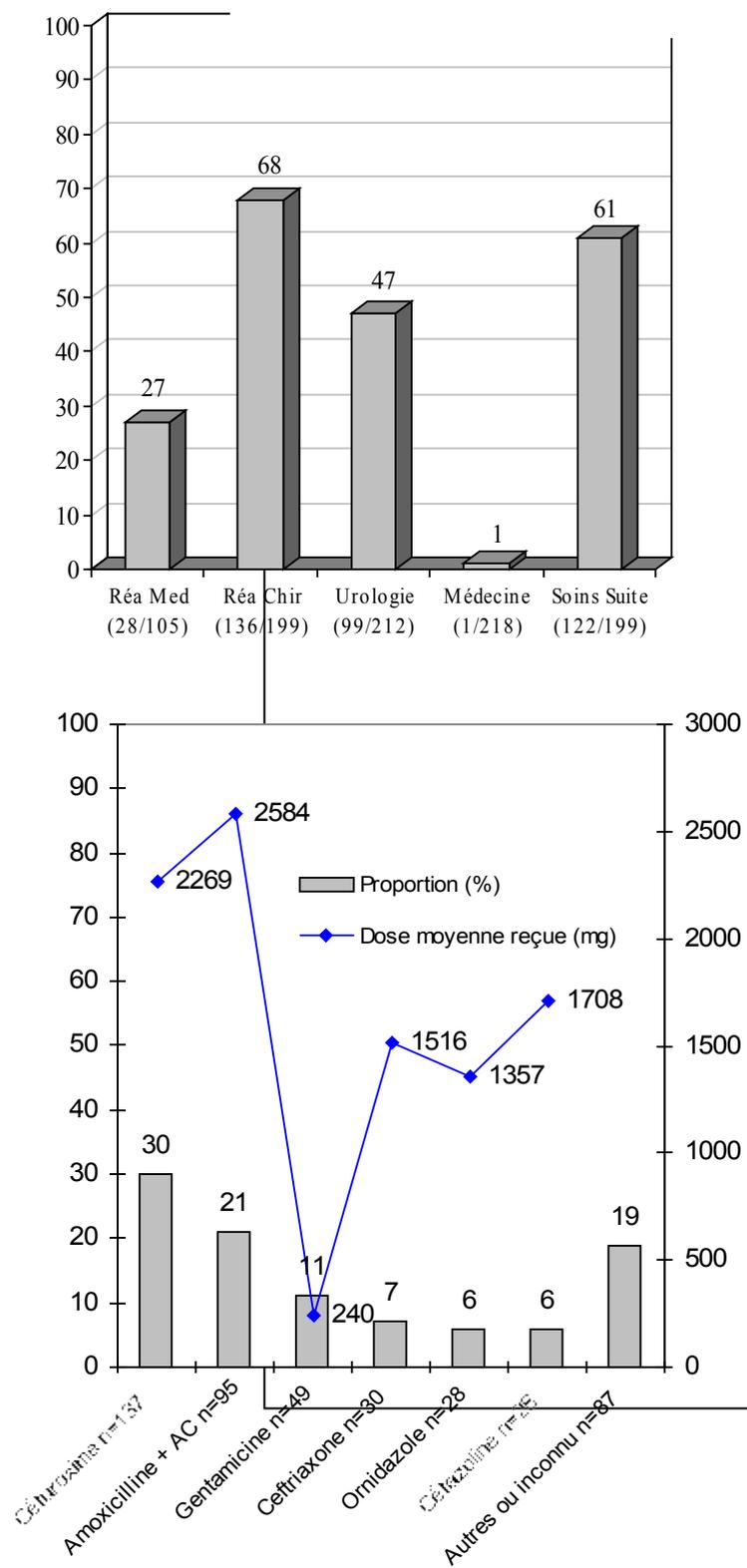
Antibiothérapie antérieure à l'hospitalisation

Deux cent vingt six patients (24%) ont reçu un traitement antibiotique dans le mois précédant leur hospitalisation dans l'un des cinq services d'hospitalisation. Les patients ayant reçu un traitement antibiotique étaient le plus souvent hospitalisés en Réanimation Médicale et Réanimation Chirurgicale (29% et 33% des patients, respectivement) (**Figure 22**). Les modalités de prescription des antibiotiques sont précisées dans le **tableau XII**.

Antibiothérapie pendant l'hospitalisation

Quatre cent quatre vingt neuf patients (52%) ont reçu un traitement pendant leur hospitalisation. Cette proportion variait de 33% en soins de suite à plus de 80% en réanimation (**Figure 23**). Les antibiotiques les plus utilisés étaient l'association amoxicilline – acide clavulanique et les fluoroquinolones.

Figure 21. Proportion (%) de patients chirurgicaux ayant été exposés à une antibioprophylaxie et répartition (%) des antibiotiques et doses reçues.



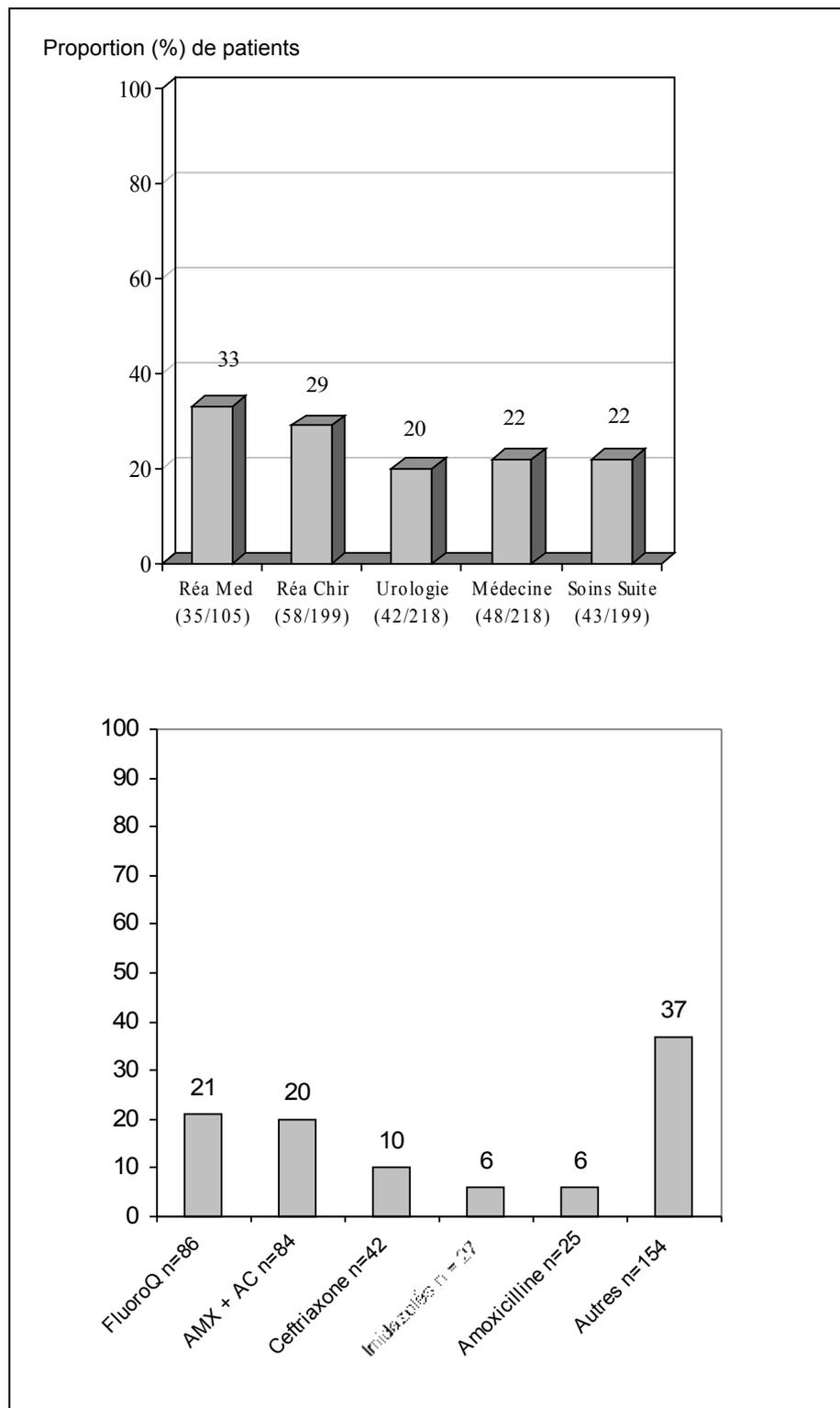


Figure 22. Proportion (%) de patients ayant été exposés à une antibiothérapie dans le mois précédant leur hospitalisation et répartition (%) des antibiotiques prescrits.

Tableau XII. Mode d'administration des principaux antibiotiques prescrits dans le mois précédant l'hospitalisation de 933 patients inclus dans 5 services différents du CHU de Nantes entre avril 2000 et mars 2002.

	Durée médiane de traitement	Posologie quotidienne médiane (mg)	Dose médiane totale reçue (mg)	Voie d'administration	
				Orale	IV
Fluoroquinolones	5 (1-30)	450 (200-1000)	2250 (1000-5000)	82%	18%
Amoxicilline	5 (1-12)	2000 (1000-12000)	10000 (5000-60000)	83%	17%
Amoxicilline + AC	4 (1-30)	2000 (1000-5000)	8000 (4000-20000)	40%	60%
Gentamicine	1,5 (1-5)	160 (120-300)	240 (180-450)	0%	100%
Ceftriaxone	2,5 (1-12)	1000 (1000-6000)	2500 (2500-15000)	7%	93%

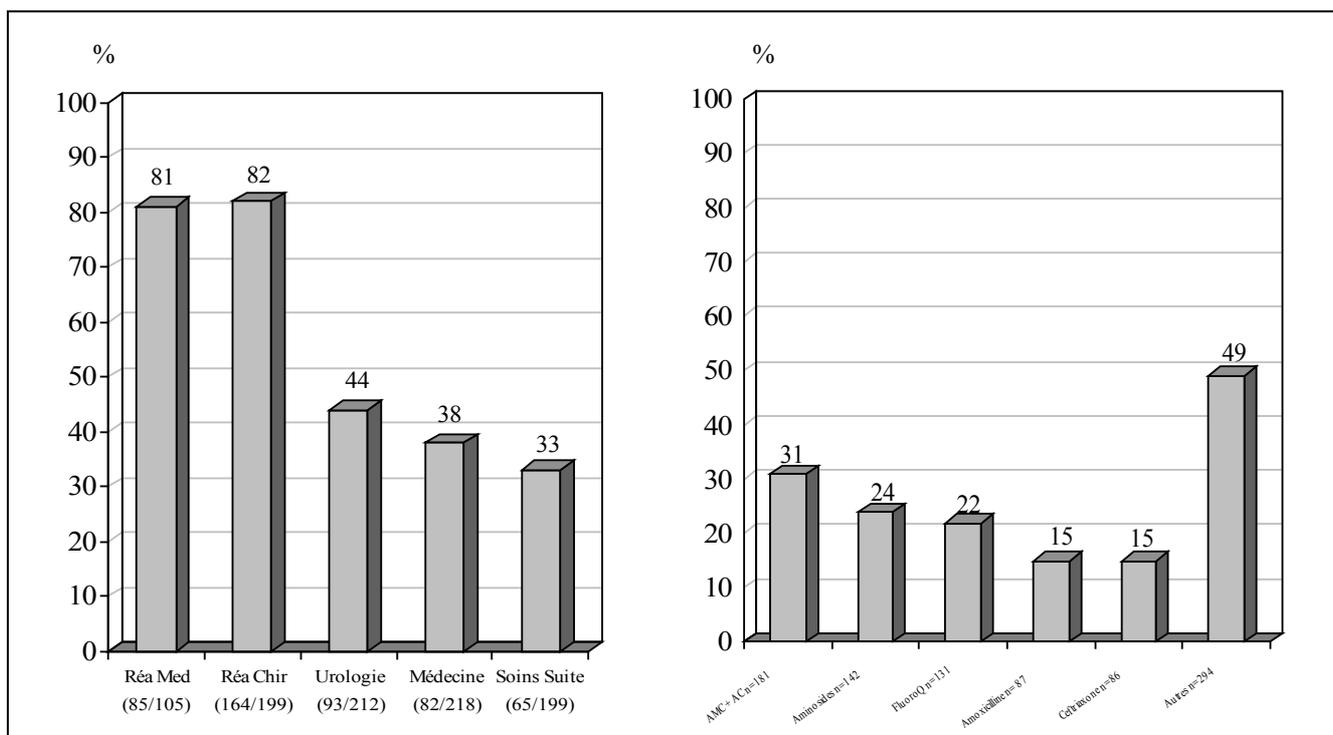


Figure 23. Proportion (%) de patients ayant été exposés à une antibiothérapie pendant leur hospitalisation et répartition (%) des molécules.

Colonisation bactérienne de la flore digestive

Identification bactérienne

Trois mille neuf cent huit écouvillons rectaux ont été analysés au laboratoire; 3713 correspondaient aux 933 patients inclus dans l'étude avec une moyenne de 4 prélèvements par patient (2-21). A l'admission, 730 patients (78.2%) étaient colonisés par des entérobactéries, 559 patients (59.9%) avec *Enterococcus spp.*, 542 (58.1%) avec *Staphylococcus spp.*, 31 (3.3%) avec *Pseudomonas spp.*, et 30 (3.2%) avec d'autres bactéries comme *Acinetobacter baumannii*.

Bactéries résistantes à l'amoxicilline

Seules les bactéries résistantes à l'amoxicilline ont été identifiées. Parmi les 933 patients, 629 étaient colonisés par une bactérie résistante à l'amoxicilline : 483 étaient colonisés par une bactérie et 146 par deux ou plus (2-4). Au total 873 bactéries résistantes à l'amoxicilline ont été isolées et analysées. Trois cent quatre patients (33%) n'étaient pas colonisés par une bactérie résistante à l'amoxicilline. Parmi les 873 bactéries isolées 67% étaient des entérobactéries (n=585), 22% des *Pseudomonas aeruginosa* (n=195), 8% des *Acinetobacter baumannii* (n=69) et 3% d'autres *Pseudomonas* (n=24). Le délai moyen de colonisation variait de 4,6 jours (médiane 2, 1-46) pour les entérobactéries à 9,6 jours (médiane 5, 1-108) pour *Pseudomonas aeruginosa* et 14,1 jours (médiane 7, 1-91) pour *Acinetobacter baumannii*. La cinétique du nombre de patients colonisés par les différentes bactéries résistantes à l'amoxicilline par espèce est illustrée **Figure 24**.

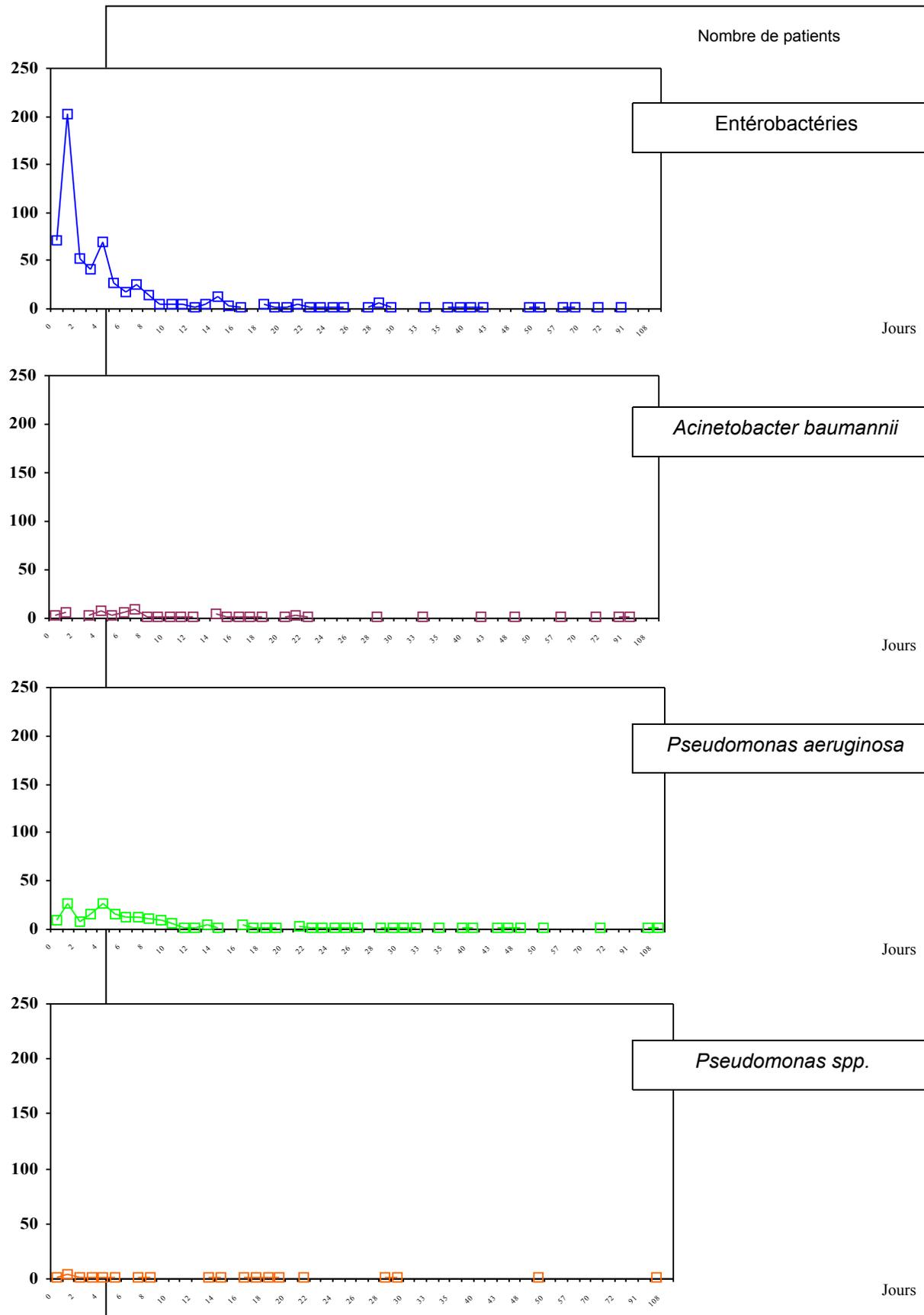


Figure 24. Cinétique de colonisation digestive des patients en fonction de la durée d'hospitalisation.

4. Présentation des travaux de recherche et commentaires

4.1 Etude des facteurs de risque de colonisation de la flore gastro-intestinale par des entérobactéries résistantes aux céphalosoprintes de 3^{ème} génération et aux fluoroquinolones (article 3)

Didier Lepelletier, Nathalie Caroff, David Riochet, Philippe Bizouarn, Aymeric Bourdeau, Florence Le Gallou, Eric Espaze, Alain Reynaud, Hervé Richet.

Risk factors for gastro-intestinal colonization with resistant *Enterobacteriaceae* among hospitalized patients: a prospective study (2006) sous presse dans *Clin Microbiol Infect.*

Commentaires de l'article 3

Cet article apporte plusieurs éléments intéressants à discuter. Il rapporte tout d'abord la résistance aux différents antibiotiques testés à partir de souches de colonisation chez 933 patients hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes sur une période de deux ans. Ce « design » en fait une étude tout à fait originale et témoigne de son ampleur, des méthodes de gestion des prélèvements avec une logistique lourde. Les taux de résistance en particulier à la ceftazidime et à l'ofloxacine variaient entre les services. Les services ont été sélectionnés pour obtenir un échantillon de patients de filières de soins différents comme des services de réanimation, de chirurgie (urologie), de médecine (médecine urgence polyvalente) et de soins de suite. Ce choix permettait d'analyser des patients aux facteurs d'hospitalisation différents et exposés à des politiques d'antibiothérapie différentes. L'exposition aux antibiotiques comme l'association amoxicilline-acide clavulanique, les C3G et surtout les fluoroquinolones variait dans de grandes proportions entre les services, l'exposition aux fluoroquinolones variant par exemple de 5% en réanimation médicale à 36% en urologie. La méthodologie d'analyse statistique utilisée (régression logistique binaire en deux modèles, pour chacune des résistances étudiées), peut être pas la plus adaptée à ce type de données, a permis tout de même de confirmer que l'exposition antérieure aux antibiotiques influençaient la résistance, et que le type de service (reflétant les politiques de prescriptions) jouait également un rôle, comme le service d'urologie par exemple.

Les analyses et commentaires supplémentaires développés ci-dessous permettent de préciser et de compléter certaines données présentées plus brièvement dans l'article 3.

Notre méthodologie ne prévoyait d'inclure que les entérobactéries résistantes à l'amoxicilline (n=585). Les milieux sélectifs ont donc été élaborés en ce sens. Les souches analysées présentaient donc soit une résistance naturelle (*Klebsiella* spp. , *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. , *Morganella morganii*, ...) soit une résistance acquise à l'amoxicilline (*Escherichia coli* et *Proteus* spp.). Les entérobactéries les plus fréquemment identifiées étaient *Escherichia coli* (39%), *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* (28%), *Enterobacter cloacae* et

Enterobacter aerogenes (17%) (**Figure 25**). Cinquante cinq souches étaient résistantes à la ceftazidime dont 20 à l'admission dans le service, et 28 souches étaient résistantes à l'ofloxacine dont la moitié à l'admission dans le service. Aucune souche n'était résistante à l'imipénème.

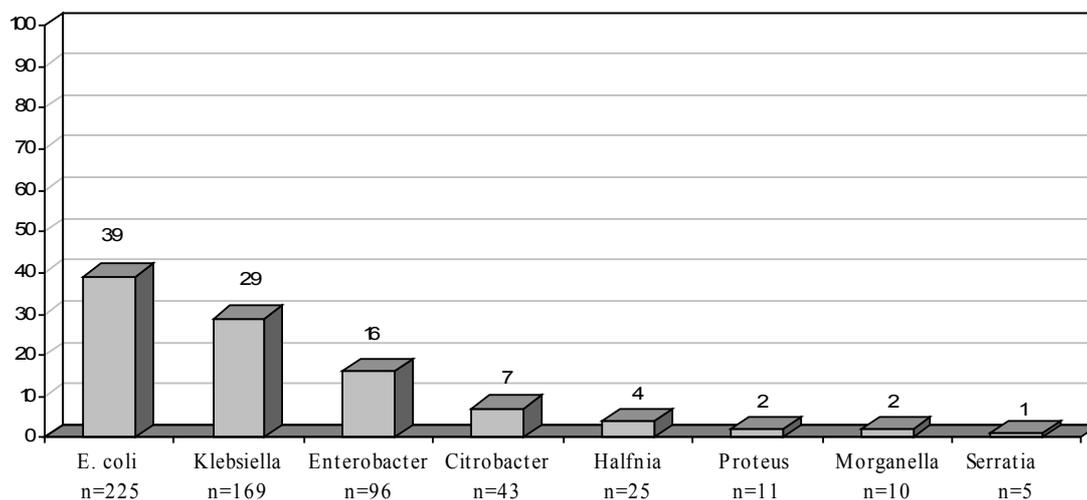


Figure 25. Répartition (%) des 585 entérobactéries résistantes à l'amoxicilline isolées de prélèvements digestifs chez 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes

Pour l'analyse des facteurs de risque de colonisation par une souche résistante à des antibiotiques utilisés en thérapeutique, nous avons choisi la résistance à la ceftazidime et aux fluoroquinolones. Pour ne pas entraîner de biais dans l'analyse, l'exposition antérieure aux antibiotiques dans le mois précédent correspondait à la période avant l'isolement de la souche, prenant ainsi en compte les souches résistantes acquises à l'admission ou en cours d'hospitalisation. L'exposition aux antibiotiques pouvait donc correspondre à une consommation en ville ou à l'hôpital. Les patients les plus exposés aux β -lactamines, en particulier l'amoxicilline-acide clavulanique et les céphalosporines de 3^{ème} génération, étaient hospitalisés en réanimation et en médecine. L'exposition à ces deux molécules était significativement associée à la résistance à la ceftazidime sans que la durée d'exposition et la dose totale administrée ne semblent jouer un rôle. Les prescriptions d'amoxicilline-acide clavulanique en ville ou en début d'hospitalisation contribuent au déséquilibre de la flore intestinale, sélectionnant des bactéries de la flore sous-

dominante, laissant apparaître des souches naturellement plus résistantes, et pouvant devenir résistantes à la ceftazidime par exposition aux céphalosporines de 3^{ème} génération, habituellement prescrites plus tardivement en hospitalisation. L'étude de Filius *et al.* (2005) analysant des patients hospitalisés ou non en réanimation a constaté le même phénomène. Les auteurs observaient une augmentation significative de la colonisation entre l'admission et la sortie de réanimation pour *Klebsiella spp.* et une diminution significative pour *E. coli*. Par ailleurs l'amoxicilline-acide clavulanique représentait 53% des prescriptions d'antibiotiques. L'exposition aux antibiotiques est l'un des facteurs pouvant expliquer la diminution du portage d'entérobactéries sensibles au-dessous d'un seuil de détection et l'apparition de bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques utilisés (Sullivan *et al.*, 2001).

L'expression graphique de ces résultats est intéressante car elle permet une visualisation facile de la relation entre exposition aux antibiotiques et résistance bactérienne. La **figure 26** compare la proportion de patients exposés à l'amoxicilline-acide clavulanique (identifié comme facteur indépendant associé à la résistance à la ceftazidime dans nos recherches) en fonction du service d'hospitalisation et le taux de résistance des entérobactéries à la ceftazidime. Les services présentant les proportions de patients exposés les plus élevées (les deux réanimations et le service de médecine) étaient les services présentant les taux de résistance les plus hauts. De même, pour identifier éventuellement des risques de transmission croisée de souches résistantes dans des services hospitalisant des patients peu exposés à l'amoxicilline-acide clavulanique, nous avons représenté les données sous une autre forme que celle proposée par Monnet *et al.* (1998) en remplaçant sur l'axe des abscisses la consommation d'antibiotiques en DDJ/1000 journées, par la proportion de patients exposés à un antibiotique donné (**Figure 27**).

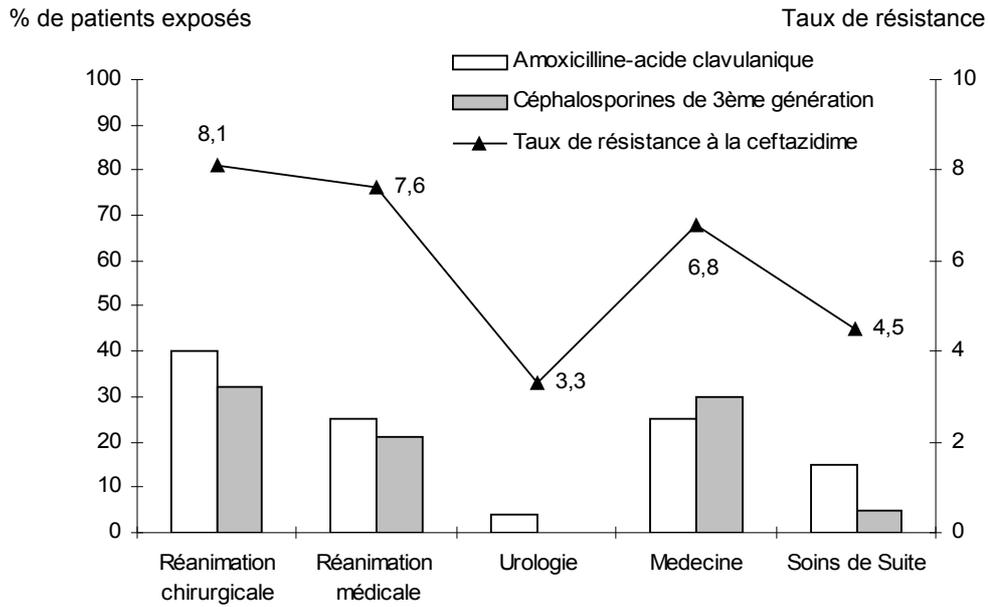


Figure 26. Taux de résistance à la ceftazidime chez des entérobactéries isolées dans la flore intestinale de 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes et répartition (%) de l'exposition aux β -lactamines.

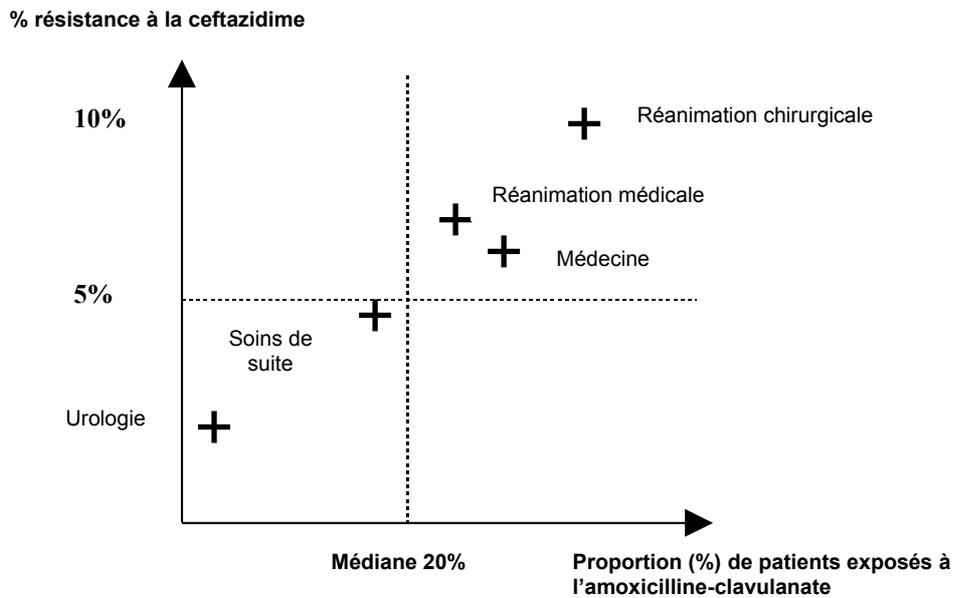


Figure 27. Croisement de la proportion (%) de patients exposés à l'amoxicilline-acide clavulanique et de la résistance à la ceftazidime chez 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes.

De la même manière, les données comparant l'exposition antérieure aux fluoroquinolones et la résistance à l'ofloxacine ont été représentées graphiquement (**Figures 28 et 29**). Le service d'urologie avait la plus forte proportion de patients exposés aux fluoroquinolones et présentait le taux de résistance aux fluoroquinolones le plus élevé. La même évolution de ces deux indicateurs était observée pour les services de réanimation chirurgicale et de soins de suite. Le service de réanimation exposait peu les patients aux fluoroquinolones et ne présentait pas de souches d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones. Par contre, le service de médecine qui exposait peu les patients aux fluoroquinolones, présentait un taux élevé de résistance. Ceci peut s'expliquer soit par la diffusion d'une souche résistante au sein du service d'hospitalisation, soit par la pression de sélection des fluoroquinolones prescrites en ville (Lautenbach *et al.*, 2004).

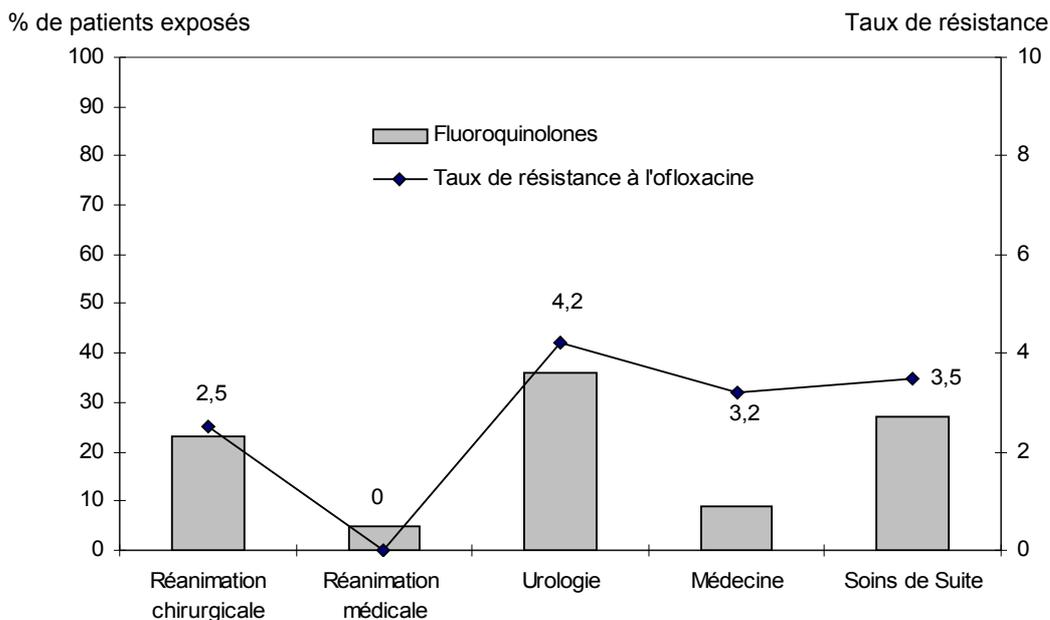


Figure 28. Taux de résistance à l'ofloxacine chez des entérobactéries isolées dans la flore intestinale de 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes et répartition (%) de l'exposition aux fluoroquinolones.

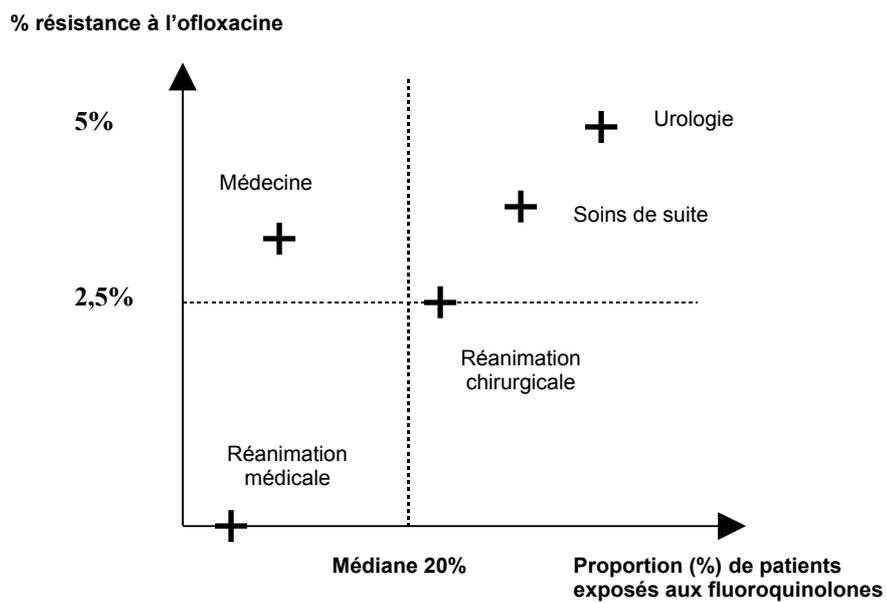


Figure 29. Croisement de la proportion (%) de patients exposés aux fluoroquinolones et de la résistance à l'ofloxacine chez 933 patients hospitalisés au CHU de Nantes.

4.2 Etude du rôle de l'hospitalisation et de l'antibiothérapie sur la colonisation gastro-intestinale par *Pseudomonas aeruginosa* (article 4)

Didier Lepelletier, Nathalie Caroff, David Riochet, Philippe Bizouarn, Aymeric Bourdeau, Florence Le Gallou, Eric Espaze, Alain Reynaud, Hervé Richet.

Role of hospital stay and antibiotic use on *Pseudomonas aeruginosa* gastro-intestinal colonization in hospital patients: a prospective study (2006). Accepté dans *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.

Commentaires de l'article 4

Comme l'article 3, cette étude de facteurs de risque de colonisation a été réalisée sur la même cohorte de patients hospitalisés dans cinq services différents du CHU de Nantes. La taille de la cohorte nous a permis de détecter 195 patients colonisés par une souche de *P. aeruginosa* et de les comparer aux 738 patients non colonisés par *P. aeruginosa*. Dans une première approche, nous avons décidé d'analyser les facteurs de risque quelle que soit la résistance de la souche, incluant les patients colonisés à l'admission, alors qu'il aurait été plus pertinent de cibler une résistance en particulier, comme la résistance à l'imipénème ou à la ciprofloxacine, afin de dégager des facteurs de risque plus spécifiques. Par ailleurs, comme dans l'article 3, l'utilisation de courbes de Kaplan-Meier et d'une modélisation de Cox aurait été plus pertinente. Cette approche méthodologique a été développée plus bas dans ces commentaires et a été appliquée en particulier à la recherche des facteurs de risque de résistance à l'imipénème (article en cours d'écriture). Les résultats de cet article 4 accepté dans *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* n'apportent finalement pas d'informations nouvelles par rapport aux connaissances scientifiques actuelles, mais décrivent une situation locale qui permet de mieux appréhender le risque infectieux lié à *P. aeruginosa* en fonction des services. Les patients hospitalisés en réanimation et aux durées de séjour élevées étaient à risque de colonisation (régression logistique binaire), et une relation directe entre exposition aux fluoroquinolones (RR 4,2), imipénème (RR 5,3) et ceftazidime (RR 12,1) et résistance aux mêmes antibiotiques étaient identifiées (analyse univariée). De même, l'analyse des phénotypes de résistance a permis d'identifier une situation épidémique en réanimation, et de confirmer le rôle de la transmission croisée dans la diffusion de la résistance. Les commentaires développés ci-dessus complètent les données publiées dans l'article 4.

Le taux de colonisation gastro-intestinale par *P. aeruginosa* variait considérablement entre les services. Le taux de colonisation à l'admission le plus élevé était observé dans le service de Médecine (9%). Parmi les 933 patients hospitalisés, 888 patients ne présentaient pas de colonisation digestive par *P. aeruginosa* à l'admission. Le taux d'acquisition pour ces patients dépassait 30% dans les deux services de réanimation. En complément des résultats décrits dans l'article 4, nous avons réalisé

des courbes de Kaplan-Meier analysant la survie cumulée (%), c'est à dire le délai sans colonisation digestive par *P. aeruginosa* en fonction de certains paramètres, comme le service d'hospitalisation ou l'exposition à un antibiotique. Ces courbes montrent que la flore digestive de tous les patients encore hospitalisés au 30^{ème} jour en réanimation chirurgicale (**Figure 30**) et au 70^{ème} jour en réanimation médicale (**Figure 31**) était colonisée par *P. aeruginosa*.

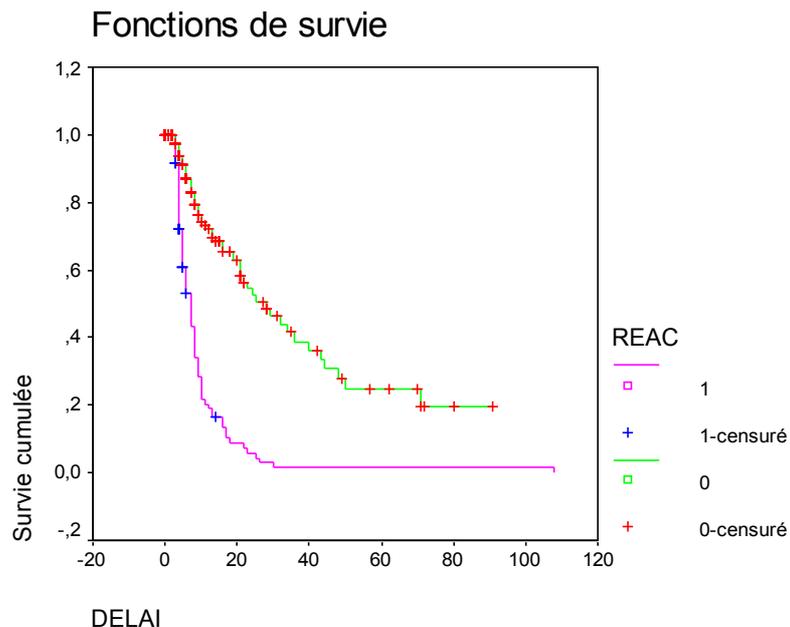


Figure 30. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par *P. aeruginosa* chez les patients hospitalisés ou non en réanimation chirurgicale (REAC) (1=événement; 0=non événement).

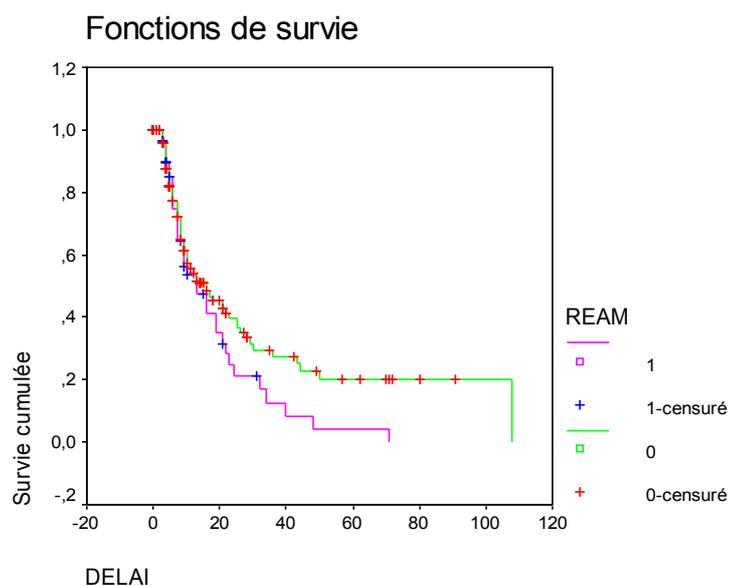


Figure 31. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par *P. aeruginosa* chez les patients hospitalisés ou non en réanimation médicale (REAM) (1=événement; 0=non événement).

Les courbes de survie analysant l'impact de l'antibiothérapie pendant l'hospitalisation (**Figure 32**) montrent qu'au 10^{ème} jour d'hospitalisation, seulement 50% des patients n'étaient pas colonisés par *P. aeruginosa* et que cette survie cumulée passait à 40% en cas d'exposition à l'amoxicilline-acide clavulanique (**Figure 33**).

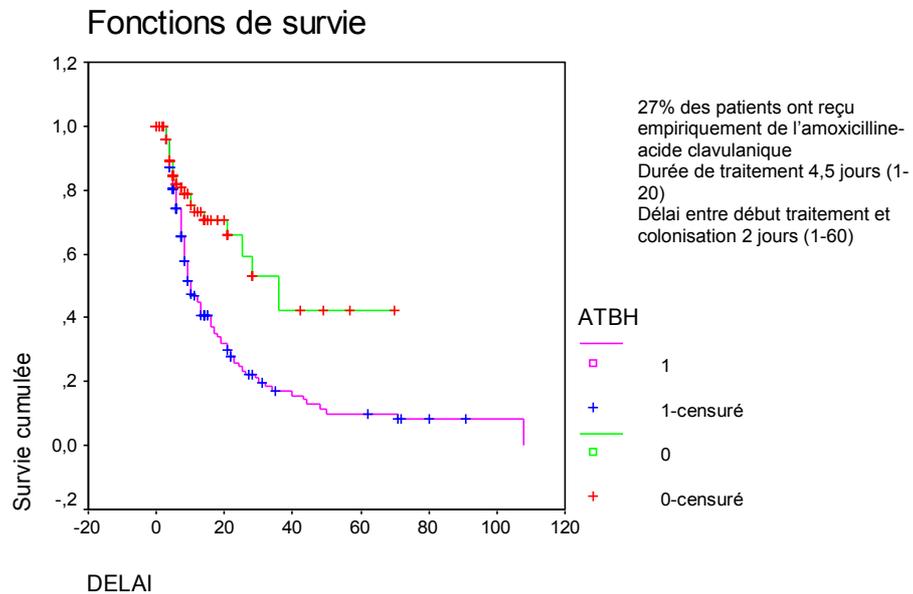


Figure 32. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par *P. aeruginosa* chez les patients exposés ou non à une antibiothérapie pendant leur hospitalisation (ATBH) (1=événement; 0=non événement).

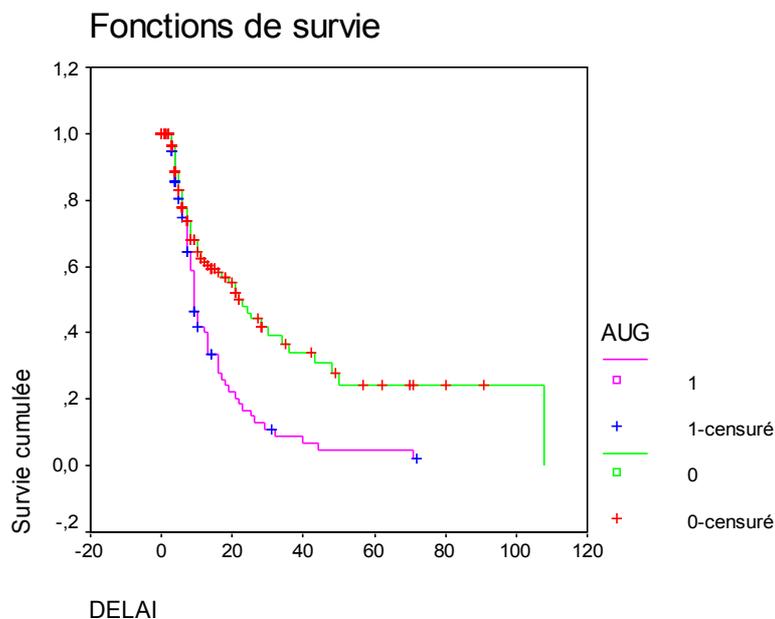


Figure 33. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par *P. aeruginosa* chez les patients exposés ou non à l'amoxicilline-acide clavulanique pendant leur hospitalisation (AUG) (1=événement; 0=non événement).

Ces observations sont tout à fait en accord avec celles publiées par Murthy *et al.* (1989) et Filius *et al.* (2005) concernant la cinétique de colonisation de la flore intestinale par *P. aeruginosa* avec une augmentation rapide de la colonisation digestive des patients hospitalisés en réanimation, suivi d'une lente disparition de la présence de *P. aeruginosa*. La présence de *P. aeruginosa* dans la flore intestinale persistait jusqu'à 3 mois après la sortie du patient de l'hôpital. Ce délai correspond probablement au temps nécessaire au retour à l'équilibre de la flore normale après exposition aux antibiotiques pour *P. aeruginosa*, car pour d'autres bactéries comme *Klebsiella spp.*, le retour à l'équilibre est beaucoup plus rapide. Filius *et al.* constataient également une forte exposition à l'amoxicilline-acide clavulanique qui atteignait 90 DDJ/1000 journées d'hospitalisation pour les patients de réanimation.

Nous avons ensuite déterminé les facteurs de risque d'acquisition de colonisation digestive par *P. aeruginosa* pendant l'hospitalisation (n=150/783), par analyse multivariée. Le modèle de Cox final retenait l'hospitalisation en réanimation comme seul facteur de risque indépendant associé à la colonisation digestive par *P. aeruginosa* (**Tableau XIII**). L'hospitalisation en réanimation peut être le reflet de la politique de prescription des antibiotiques (non associée à la colonisation en analyse multivariée), mais aussi de la transmission croisée.

Cette étude nous a permis également de décrire la résistance aux antibiotiques des *P. aeruginosa* issus de la flore digestive. Seize pour cent des souches de *P. aeruginosa* étaient résistantes à la ticarcilline, 2,6% à la ceftazidime, 20% à l'imipénème, et 40% à l'ofloxacine. Les taux de résistance étaient plus élevés pour les souches acquises pendant l'hospitalisation (**Figure 34**).

Tableau XIII. Facteurs de risque associés à la colonisation digestive par *P. aeruginosa* pour les patients détectés négatifs à l'admission. Analyse multivariée (modèle de Cox) par méthode descendante conditionnelle.

Modèle initial

	ORa	95%IC	P
Hospitalisation en réanimation chirurgicale	10,190	4,3-23,609	0,000
Transfert d'un autre service	1,662	1,089-2,537	0,019
Antécédent d'hospitalisation < 1 an	1,367	0,886-2,109	0,158
Hospitalisation en réanimation médicale	5,164	2,064-12,916	0,000
Antécédent de chirurgie < 1 mois	,876	0,582-1,318	0,524
Immunodépression	,809	0,465-1,407	0,453
Broncho-pneumopathie chronique obstructive	1,297	0,696-2,417	0,414
Présence d'un cathéter veineux central	1,110	0,553-2,225	0,769
Présence d'une intubation	,690	0,295-1,610	0,390
Antibiothérapie dans le mois précédant l'hospitalisation	1,153	0,748-1,776	0,519
Antibiothérapie pendant l'hospitalisation	,591	0,339-1,033	0,065

Modèle final

	OR	95%IC	P
Hospitalisation en réanimation chirurgicale	6,447	4,185-9,933	0,000
Hospitalisation en réanimation médicale	3,251	1,998-5,289	0,000

ORa: Odds ratio ajusté; 95%IC: intervalle de confiance à 95%. Test de spécification du modèle $P < 0,0001$.

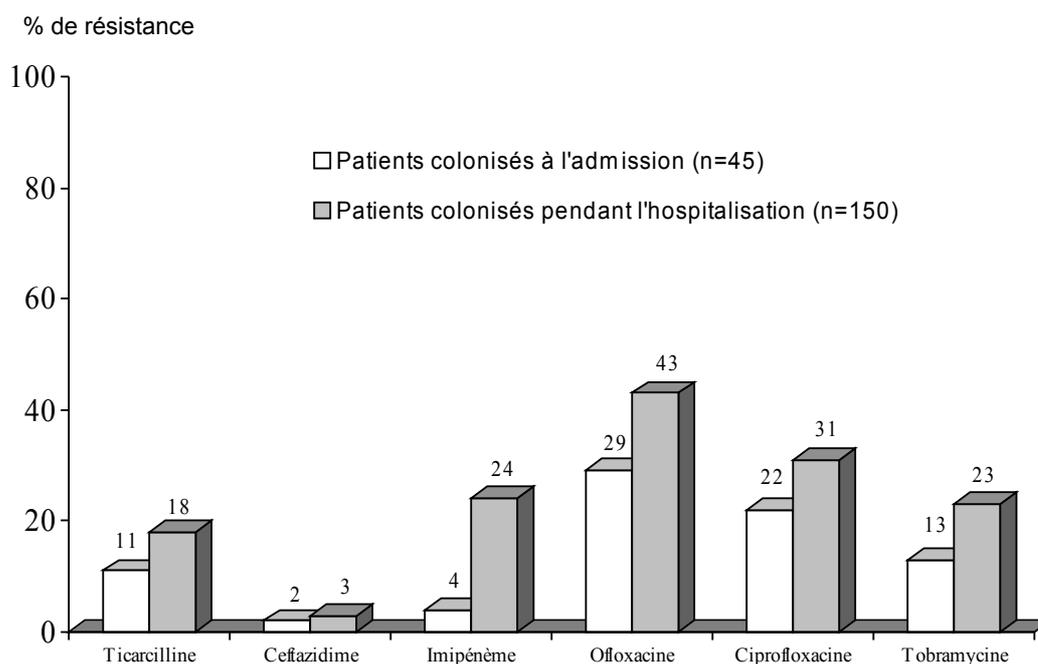


Figure 34. Résistance aux antibiotiques de souches de *P. aeruginosa* isolées la flore intestinale chez 933 patients hospitalisés dans 5 services du CHU de Nantes

Comme nous l'avons vu un peu plus haut dans nos commentaires, les taux de colonisation digestive par *P. aeruginosa* à l'admission, mais surtout les taux d'acquisition en cours d'hospitalisation variaient considérablement entre les services. En particulier, les taux élevés d'acquisition de colonisation digestive par *P.*

aeruginosa en réanimation évoquaient une situation épidémique par diffusion d'une ou plusieurs souches clonales. Nous avons donc dans un premier temps, en complément des résultats évoqués ci-dessus et dans l'article 4, analysé les souches de réanimation par méthodes phénotypiques comme l'antibiotypie et la sérotypie O (Pitt 1988, International *P. aeruginosa* Typing Study group, 1993). Cependant, leur valeur est limitée par l'acquisition fréquente et rapide de résistance aux antibiotiques, et par la présence de nombreuses souches polyagglutinables ou non agglutinables. Les méthodes génotypiques sont plus discriminantes (Talon *et al.*, 1996). Elles étudient le polymorphisme de restriction de régions spécifiques de l'ADN, utilisant l'amplification génique ou surtout l'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN chromosomique. Nous avons donc dans un deuxième temps, analysé les souches de *P. aeruginosa* isolées de la flore intestinale des patients hospitalisés en réanimation par électrophorèse en champ pulsé afin de vérifier l'hypothèse d'une diffusion clonale. Les phénotypes des souches de *P. aeruginosa* isolés des 195 patients colonisés dans notre étude sont décrits dans le **tableau XIV**.

Tableau XIV. Différents phénotypes de résistance observés parmi 195 souches de *P. Aeruginosa* isolé de la flore intestinale de 933 patients hospitalisés dans 5 services du CHU de Nantes de 2000 à 2002.

Phénotypes	TIC	CAZ	IPM	OFX	CIP
1	S	S	S	S	S
2	S	S	R	R	R
3	R	S	S	R	R
4	S	S	R	S	S
5	S	S	S	R	R
6	S	S	S	R	S
7	R	S	S	S	S
8	S	S	R	R	S
9	R	S	S	R	S

TIC: ticarcilline; CAZ: ceftazidime; IPM: imipénème; OFX: ofloxacine; CIP: ciprofloxacine; S: sensible; R: intermédiaire ou résistant.

Ainsi, parmi les 199 patients hospitalisés en réanimation chirurgicale, 95 patients étaient colonisés par *P. aeruginosa*. Treize patients étaient colonisés à l'admission et 82 patients négatifs à l'entrée ont acquis leur colonisation pendant l'hospitalisation. Parmi les souches de colonisation digestive des 82 patients ayant acquis leur colonisation pendant l'hospitalisation, 58 souches étaient polyagglutinables (PAG) et 12 étaient de sérotype O6. Ces 70 souches ont été analysées dans un premier temps par phénotypage (**Tableau XV**).

Tableau XV. Phénotypes de résistance de 70 souches de *P. aeruginosa* isolés de la flore intestinale de patients hospitalisés en réanimation.

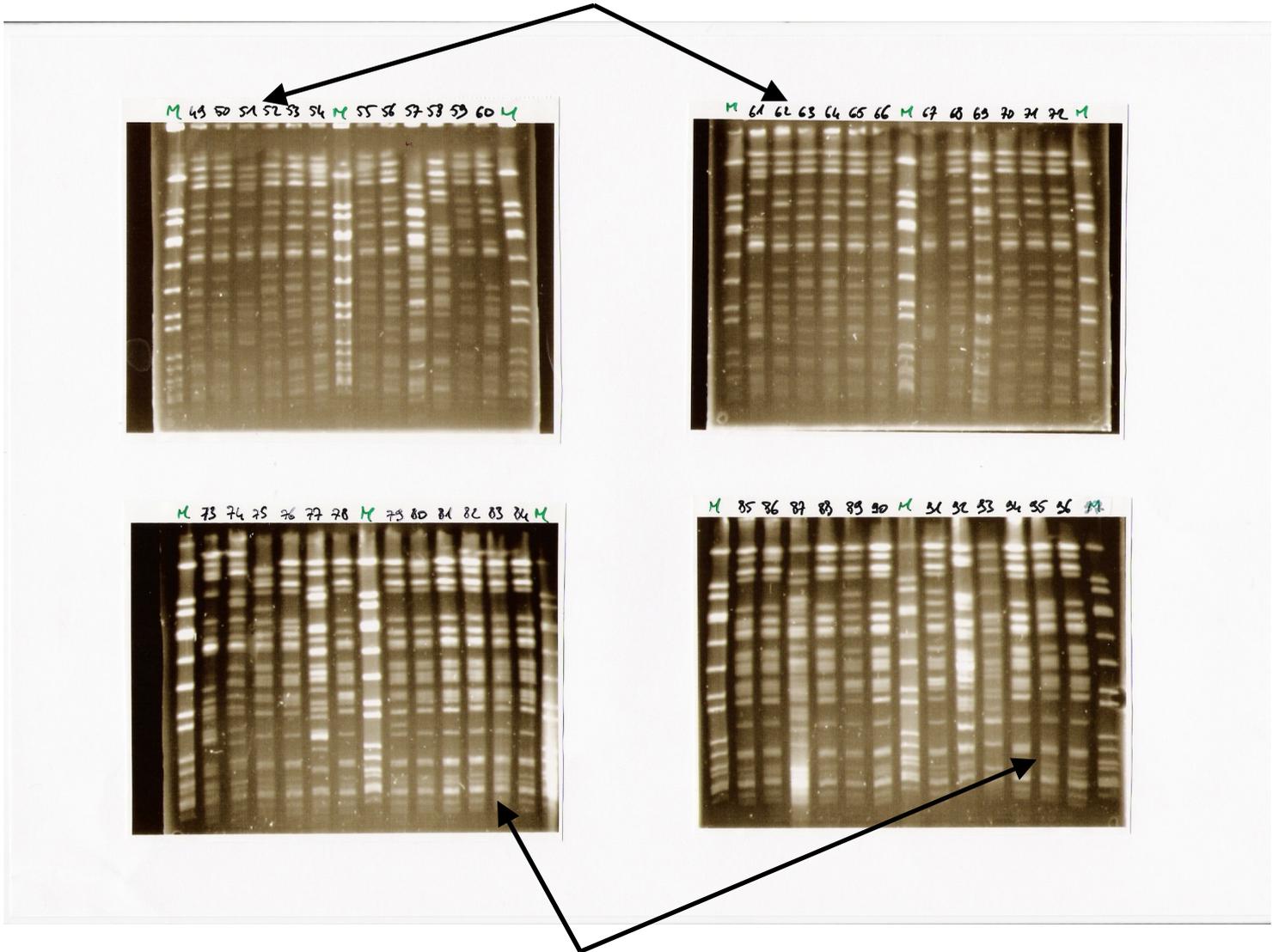
Phénotypes	Souches de <i>P. aeruginosa</i>	
	PAG N=58	O6 N=12
1 (SSSSS)	23 (40%)	3 (25%)
2 (SSRRR)	14 (24%)	4 (34%)
3 (RSSRR)	4 (7%)	1 (8%)
4 (SSRSS)	6 (10%)	1 (8%)
5 (SSSRR)	4 (7%)	-
6 (SSSRS)	3 (5%)	2 (17%)
Autres	4 (7%)	1 (8%)

PAG: souches polyagglutinables

Les phénotypes 1 et 2 étaient les plus fréquents, représentant 64% des souches PAG et 59% des souches de sérotype O6. Parmi ces souches, aucune n'était résistante à la ceftazidime, 38% (27/58) des souches PAG et 50% (6/12) des souches O6 étaient résistantes à l'imipénème; 47% (27/58) des souches PAG et 67% (8/12) des souches O6 étaient résistantes à l'ofloxacine; et 38% (22/58) des souches PAG et 50% (6/12) des souches O6 étaient résistantes à la ciprofloxacine. Ces taux élevés de résistance à l'imipénème et aux fluoroquinolones, notamment les souches présentant le phénotype 2, pouvaient évoquer une diffusion clonale. Pour confirmer cette hypothèse, 60 souches PAG et de sérotype O6 ont été analysées par génotypage.

Les résultats confirmaient la présence de deux clones principaux, correspondant aux phénotypes 1 (SSSSS) et 2 (SSRRR) au sein des souches PAG et de sérotype O6 confirmant la diffusion de plusieurs clones au sein du service de réanimation (**Figure 35**).

Phénotype 2 (SSRRR)
Souches PAG et O6



Phénotype 1 (SSSSS)
Souches PAG et O6

Figure 35. Analyse génotypique par électrophorèse en champ pulsé de souches polyagglutinables et de sérotype O6 de *P. aeruginosa* isolées de la flore digestive de patients hospitalisés en réanimation.

Phénotype SSSSS: souches sensibles à la ticarcilline, ceftazidime, imipénème, ofloxacine, ciprofloxacine.

Phénotype SSRRR: souches sensibles à la ticarcilline, ceftazidime et résistantes à l'imipénème, ofloxacine, ciprofloxacine.

Nous nous sommes ensuite particulièrement intéressés à la résistance de *P. aeruginosa* à l'imipénème. Nous avons étudié en particulier chez six patients, des couples de souches présentant une différence de sensibilité à l'imipénème, isolées successivement chez un même patient (**Figure 36**). Toutes les souches ont chronologiquement évolué de la sensibilité vers la résistance à l'imipénème, à l'exception de deux patients pour lesquels la souche résistante a été isolée avant la souche sensible. L'analyse des traitements antibiotiques reçus montrait que les quatre patients chez qui des mutants résistants avaient émergé *in vivo* avaient reçu de l'imipénème dans l'intervalle de temps compris entre l'isolement de la souche sensible et celui de la souche résistante. En revanche, les deux patients colonisés initialement pour une souche résistante n'avaient pas reçu d'imipénème. Les profils de restriction de l'ADN total, obtenus par électrophorèse en champ pulsé, étaient identiques pour les deux souches d'un même couple. Les souches de patients différents présentaient des pulsotypes différents entre eux, sauf pour les deux patients colonisés initialement par une souche résistante. Cette souche clonale correspondait au phénotype 2 évoqué plus haut dans ces commentaires.

Afin de déterminer les facteurs de risque de colonisation, nous avons comparé à l'aide du logiciel SPSS® en analyse univariée (**Tableau XVI**) et multivariée (**Tableau XVII**) les patients colonisés par une souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème (PARI) à deux groupes de patients, d'une part les patients colonisés par une souche de *P. aeruginosa* sensible à l'imipénème (PASI) et d'autre part les patients détectés non colonisés par une souche de *P. aeruginosa* (PNC). En analyse multivariée par régression logistique (méthode d'analyse ascendante avec qualité d'ajustement de Hosmer-Lemeshow), les facteurs de risque retrouvés étaient la présence d'un cathéter veineux central et l'exposition à l'imipénème pour la première comparaison (PARI vs. PASI). Pour la deuxième comparaison (PARI vs. PNC), les facteurs de risque indépendants étaient le sexe, la durée d'hospitalisation, la présence d'un cathéter veineux central, l'exposition à l'imipénème et à l'amoxicilline-acide clavulanique.

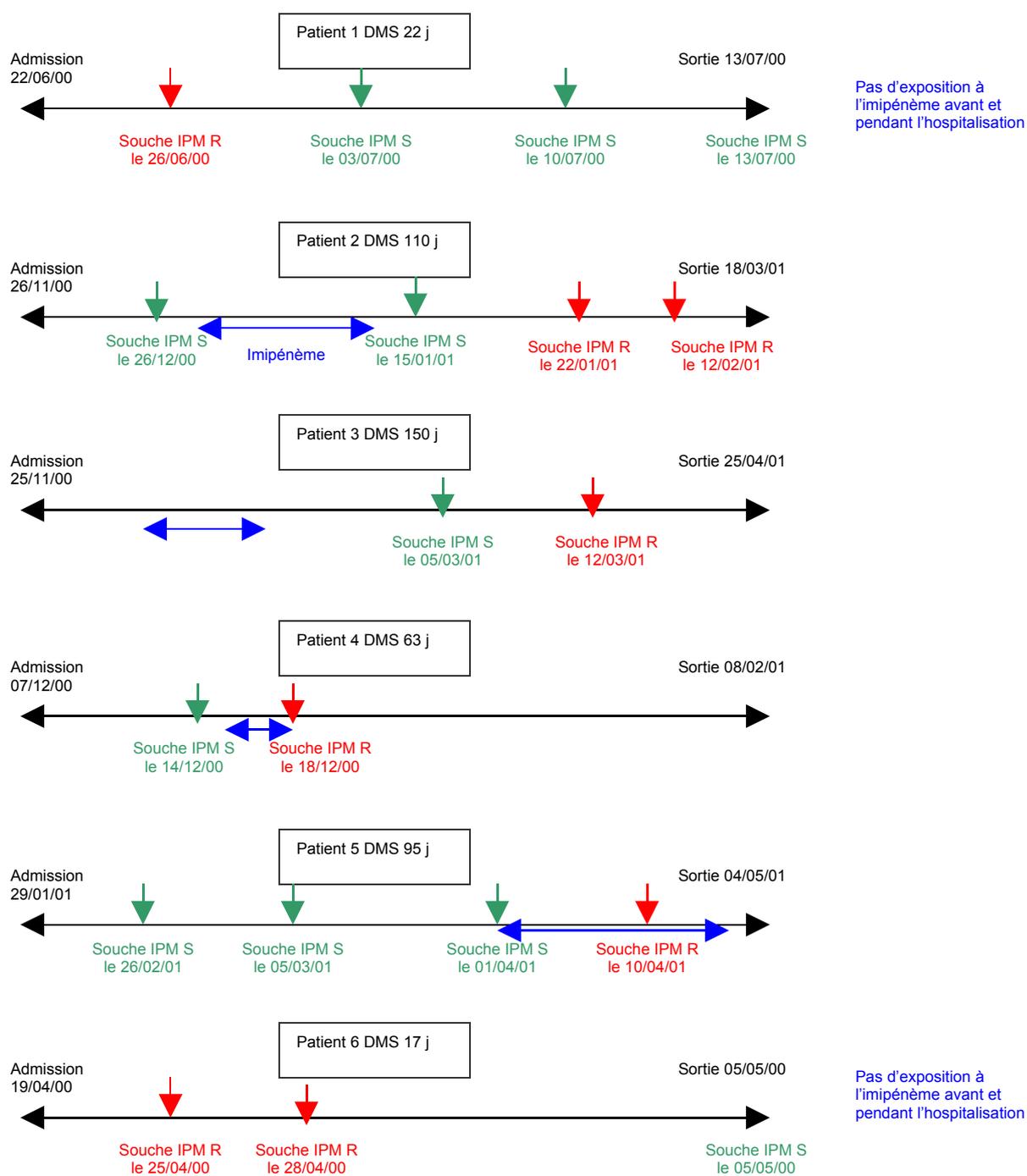


Figure 36. Chronologie des isolations de souches de *P. aeruginosa* en cours d'hospitalisation et exposition à l'imipénème (IPM-R: souche résistante à l'imipénème; IPM-S: souche sensible à l'imipénème).

Tableau XVI. Facteurs de risque de colonisation digestive par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* résistante à l'imipénème (analyse univariée).

Variables	Patients PARI n=46	Comparaison 1			Comparaison 2		
		PASI	RR (95%IC)	P	PNC	RR (95%IC)	P
		n=145			n=742		
Sexe masculin	36 (78)	86 (59)	2,0 (1,1-3,8)	<0,02	401 (54)	2,9 (1,5-5,7)	<0,001
Age moyen	53 (20)	61 (21)	-	<0,02	67 (19)	-	<0,002
DMS	22 (18)	17 (16)	-	0,09	14 (16)	-	<0,0008
Transfert	27 (59)	82 (57)	1,1 (0,6-1,8)	0,79	469 (63)	0,8 (0,5-1,5)	0,53
Hospitalisation <1 an	23 (50)	83 (57)	0,8 (0,5-1,3)	0,39	421 (57)	0,8 (0,4-1,4)	0,37
Chirurgie <1 mois	36 (78)	86 (59)	2,0 (1,1-3,8)	<0,02	420 (57)	2,6 (1,3-5,2)	<0,0004
Immunodépression	4 (9)	21 (14)	0,6 (0,2-1,6)	0,31	81 (11)	0,8 (0,3-2,1)	0,80
BPCO	5 (11)	14 (10)	1,1 (0,5-2,5)	0,78	42 (6)	1,9 (0,8-4,6)	0,18
CVC	40 (87)	76 (52)	4,3 (1,9-9,6)	<0,0001	161 (22)	19,5 (8,4-45,2)	<0,0001
Hospitalisation en USI	30 (65)	61 (42)	2,1 (1,2-3,5)	<0,006	108 (15)	8,8 (4,9-15,8)	<0,0001
chirurgicale							
Hospitalisation en USI	11 (24)	26 (18)	1,3 (0,7-2,3)	0,37	69 (9)	2,8 (1,5-5,2)	<0,004
médicale							
Prise d'imipénème	12 (26)	14 (10)	2,2 (1,3-3,7)	<0,004	14 (2)	10,3 (6,1-17,6)	<0,0001
Prise d'AMC	27 (59)	67 (46)	1,5 (0,9-2,4)	0,14	151 (20)	4,9 (2,8-8,5)	<0,0001

RR: Risque relatif; 95%IC: intervalle de confiance à 95%; PARI: *Pseudomonas aeruginosa* résistant à l'imipénème; PASI: *Pseudomonas aeruginosa* sensible à l'imipénème; PNC: patients non colonisés à *Pseudomonas aeruginosa*; DMS: durée moyenne de séjour supérieure à 9 jours; BPCO: broncho-pneumopathie chronique obstructive; CVC: cathéter veineux central; USI: Unité de Soins Intensifs; AMC: amoxicilline-acide clavulanique.

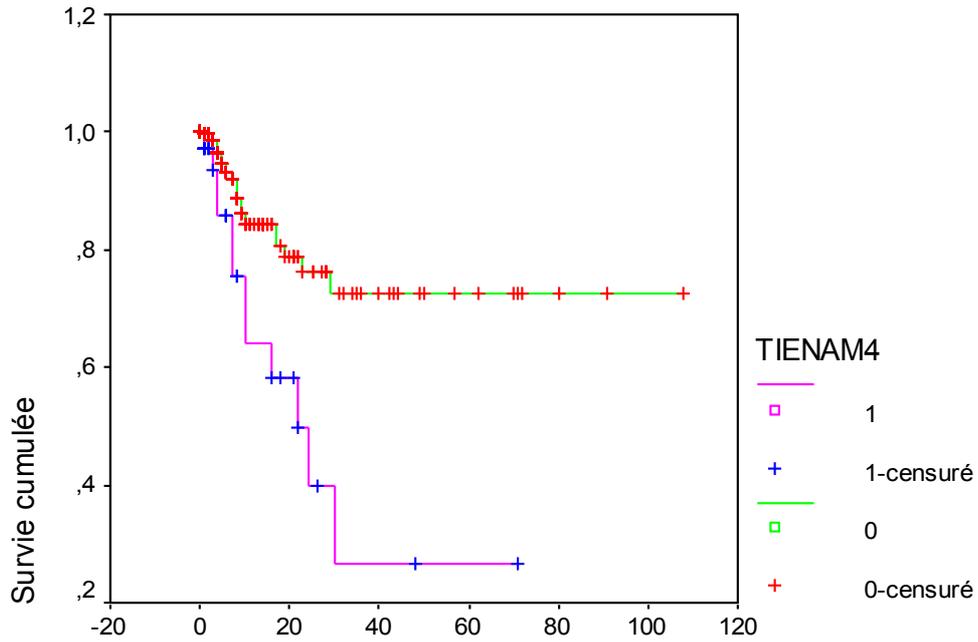
Tableau XVII. Facteurs de risque de colonisation digestive par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* résistante à l'imipénème en analyse multivariée par rapport à des patients colonisés par une souche sensible à l'imipénème^a et des patients non colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*^b.

Variables	Comparaison 1 ^a		Comparaison 2 ^b	
	ORa (95%IC)	P	ORa (95%IC)	P
Sexe masculin	-	-	2,7 (1,1-6,2)	<0,02
DMS	-	-	3,9 (1,7-8,9)	<0,001
CVC	5,2 (2,1-13,2)	<0,0001	13,3 (5,2-33,9)	<0,0001
Prise d'imipénème	3,1 (1,2-7,9)	<0,017	6,1 (2,1-16,7)	<0,001
Prise d'AMC	-	-	2,3 (1,1-4,8)	<0,02

ORa: Odds ratio ajusté; 95%IC: intervalle de confiance à 95%; DMS: durée moyenne de séjour supérieure à 9 jours; CVC: cathéter veineux central; AMC: amoxicilline-acide clavulanique. Test d'adéquation d'Hosmer et Lemeshow <0,821 (comparaison 1) et <0,000 (comparaison 2).

La courbe de survie par méthode de Kaplan-Meier (**Figure 37**) montre que la colonisation digestive par une souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème chez les patients exposés à l'imipénème était extrêmement rapide (survie de 40% à 3 semaines) alors que la survie chez les patients non exposés à l'imipénème atteignait 75% au 30^{ème} jour sans aucune modification observée au delà de ce délai.

Fonctions de survie



DELAI

Figure 37. Courbes de survie par méthode de Kaplan-Meier. Analyse de la colonisation digestive par une souche de *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème chez les patients exposés ou non à l'imipénème (TIENAM4) pendant leur hospitalisation (1=événement; 0=non événement).

4.3 Etude de la relation colonisation digestive - infections causées par *P. aeruginosa*

Caractéristique des patients infectés

Parmi les 933 patients hospitalisés, 57 ont développé une infection par *P. aeruginosa* (6,1%); 68% étaient des hommes, l'âge moyen était de 53 ans (16-89). Quarante huit infections (84%) étaient acquises pendant l'hospitalisation lors des soins, 8 (14%) étaient importées d'un autre service ou d'un autre établissement et une (2%) était communautaire. Les principales infections étaient des pneumopathies (n=31, 54%), toutes observées en réanimation, et les infections urinaires (n=14, 25%). Le délai moyen d'apparition des infections était de 14 jours (0-63).

Résistance aux antibiotiques des souches d'infections

Les principales souches étaient soit polyagglutinables (15/57, 26%), soit de sérotype O6 (14/57, 25%) et O9 (7/57, 12%). Les souches d'infection présentaient des pourcentages de résistance aux antibiotiques plus élevés que les souches de colonisation digestive, notamment pour la résistance à la ceftazidime (**Figure 38**).

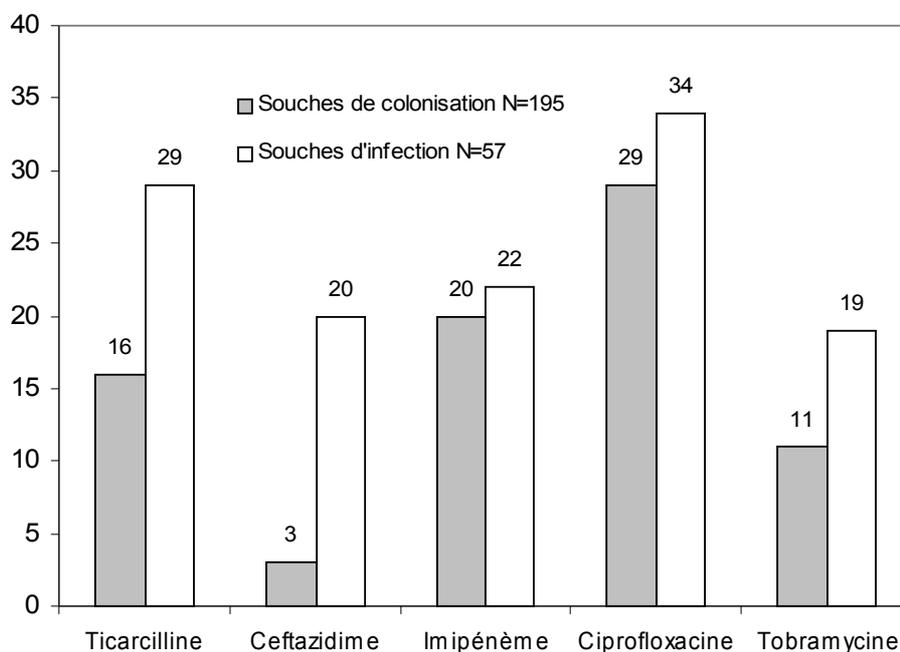


Figure 38. Pourcentage de résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* isolé chez des patients hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes entre 2000 et 2002.

Ces taux de résistance de souches de *P. aeruginosa* responsables d'infections étaient comparables à ceux observés pour les patients de réanimation aux USA (ceftazidime 18,2%, imipénème 22,5%, ciprofloxacine 32,2%) mais plus élevés que ceux observés au Royaume Uni (ceftazidime 2,9%, imipénème 15,6%, ciprofloxacine 6,4%) (Livermore, 2002).

Facteurs de risque d'infections causées par *P. aeruginosa*

Les facteurs de risque associés à la survenue d'une infection causée par *P. aeruginosa* en analyse univariée sont présentés dans le **Tableau XVIII**.

Tableau XVIII. Facteurs de risque associés aux infections à *P. aeruginosa* chez 933 patients hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes entre 2000 et 2002 (analyse univariée).

Facteurs	Infection à <i>P. aeruginosa</i>		RR	95%IC	P
	Oui	Non			
	N=57	N=876			
Sexe masculin	39	483	1,7	1,0-2,9	<0,05
Age (années)	53	62	-	-	<0,0006
Durée moyenne de séjour (jours)	28	14	-	-	<0,0001
Hospitalisation en Réanimation chirurgicale	39	162	7,9	4,6-13,5	<0,0001
Hospitalisation en Réanimation médicale	12	94	2,1	1,1-3,8	<0,01
Hospitalisation < 1 an	24	504	0,6	0,3-0,9	<0,02
Transfert hospitalier	51	796	0,9	0,4-1,9	0,72
Chirurgie < 1 mois	40	501	1,7	1,0-2,9	<0,05
Immunodépression	3	102	0,4	0,1-1,4	0,13
Diabète	6	103	0,9	0,4-2,1	0,78
Dialyse chronique	6	23	3,7	1,7-7,8	<0,0008
Broncho-pneumopathie chronique obstructive	7	53	2,1	1,0-4,3	0,08
Cathéter veineux central	50	229	16,7	7,7-36,4	<0,0001
Intubation	52	217	22,5	10,1-50,2	<0,0001
Antibiothérapie antérieure < 1 mois	19	209	1,5	0,9-2,6	0,10
Antibiothérapie antérieure par amoxicilline+acide clavulanique	19	126	2,7	1,6-4,6	<0,0001
Antibiothérapie pendant l'hospitalisation par amoxicilline+acide clavulanique	57	432	NC	NC	<0,0001
Antibiothérapie pendant l'hospitalisation par fluoroquinolones	21	161	2,4	1,4-4,1	<0,0006
Colonisation digestive à <i>P. aeruginosa</i>	39	156	8,2	4,8-14,1	<0,0001

RR: Risque relatif; 95%IC: intervalle de confiance à 95%.

En analyse multivariée par régression logistique binaire descendante conditionnelle, la durée de séjour supérieure à 9 jours, l'intubation, l'exposition aux fluoroquinolones, la colonisation digestive par *P. aeruginosa* et l'hospitalisation en réanimation chirurgicale étaient les facteurs de risque indépendants associés aux infections causées par *P. aeruginosa* (**Tableau XIX**).

Tableau XIX. Facteurs de risque associés aux infections à *P. aeruginosa* chez 933 patients hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes entre 2000 et 2002 (analyse multivariée par régression logistique binaire, SPSS®).

	ORa	95%IC	P
Durée moyenne de séjour (jours)	8,569	3,163-23,218	<0,000
Hospitalisation en Réanimation chirurgicale	2,443	1,118-5,340	<0,025
Colonisation digestive à <i>P. aeruginosa</i>	2,123	1,036-4,351	<0,040
Antibiothérapie par fluoroquinolones	7,170	3,366-15,270	<0,000
Intubation	10,849	4,102-28,694	<0,000

ORa: Odds ratio ajusté; 95%IC: intervalle de confiance à 95%. Test d'adéquation d'Hosmer et Lemeshow <0,147.

Relation colonisation digestive – infection causée par *P. aeruginosa*

La comparaison des 195 patients colonisés à *P. aeruginosa* et des 57 patients ayant développé une infection à *P. aeruginosa*, montrait que les patients infectés restaient hospitalisés plus longtemps que les patients seulement colonisés, étaient plus souvent hospitalisés en Réanimation chirurgicale et en Médecine, étaient plus souvent transférés depuis un autre service ou établissement et étaient plus souvent des malades chirurgicaux, plus souvent dialysés et porteurs de cathéters veineux centraux, et ayant reçu plus souvent une antibiothérapie pendant l'hospitalisation.

Parmi les 57 patients infectés par *P. aeruginosa*, 39 avaient été détectés colonisés par une souche de *P. aeruginosa*. Nous avons analysé les phénotypes et sérotypes, ainsi que les dates d'isolement des souches de colonisation et d'infection chez ces 39 patients (**Annexe 1**). Seules les souches de 11 patients ont pu être comparées par génotypie (électrophorèse en champ pulsé). Les souches étaient similaires dans 5 cas sur 11 (**Figure 39**).

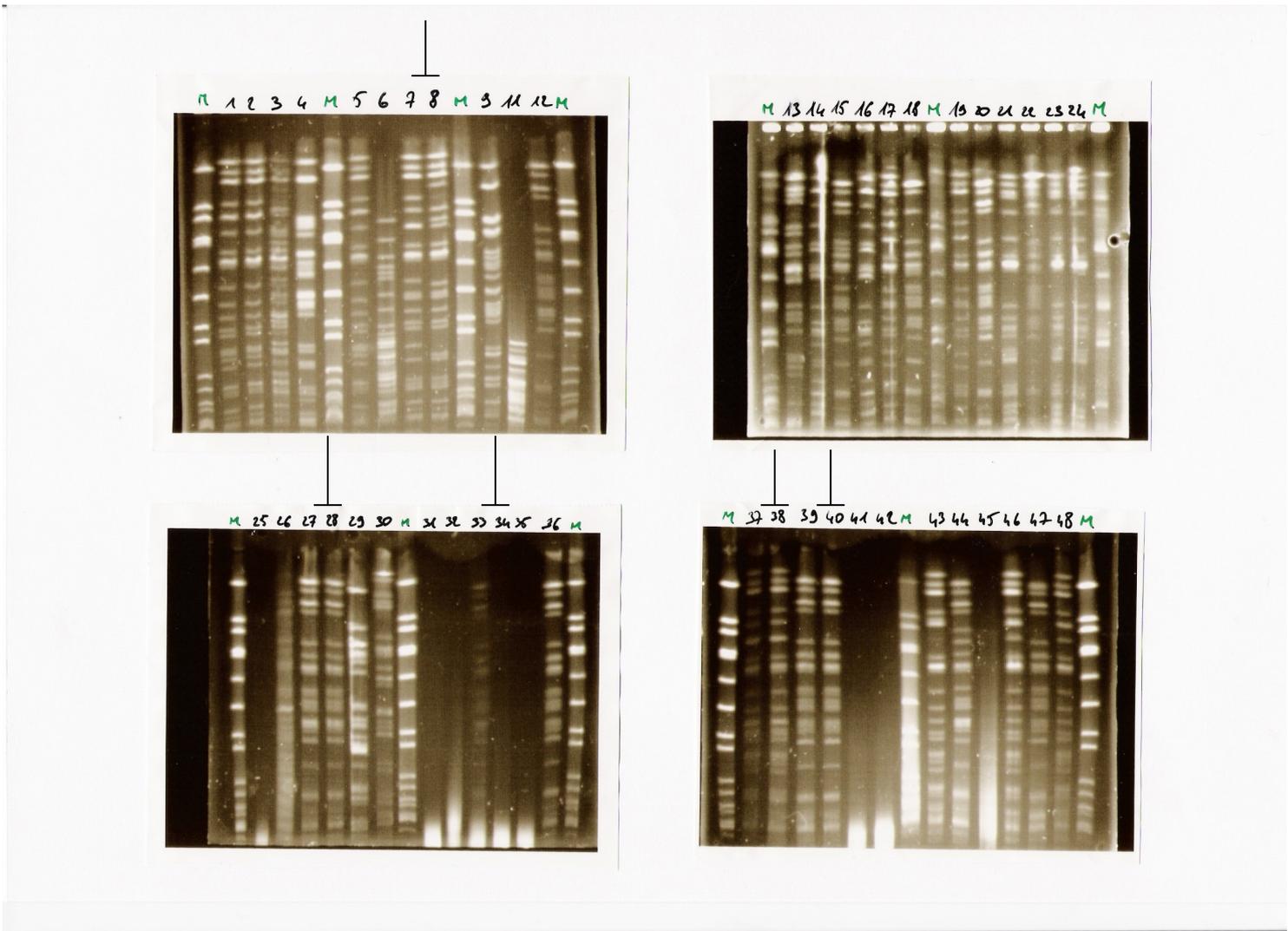


Figure 39. Analyse génotypique par électrophorèse en champ pulsé de souches de *P. aeruginosa* isolées de la flore digestive et de prélèvements cliniques chez des patients hospitalisés.

Souches de colonisation digestive et d'infection identiques en analyse par électrophère en champ pulsé

DISCUSSION GENERALE

Pendant de nombreuses années, la résistance bactérienne aux antibiotiques a été, particulièrement en France, l'objet d'une simple curiosité, dans la dynamique du progrès de l'industrie pharmaceutique. Elle passionnait plus par ses mécanismes de résistance que sa capacité à diffuser. Mais l'apparition de bactéries pathogènes devenues résistantes aux antibiotiques et leur diffusion dans les populations humaines constituent un des phénomènes émergents majeurs de ces vingt dernières années. Cette évolution se concrétise par des taux élevés de multirésistance de certaines espèces bactériennes qui étaient multisensibles il y a cinquante ans. Pour la plupart des agents pathogènes, l'exposition des populations aux antibiotiques est une condition indispensable à l'émergence d'un nouveau mécanisme de résistance et à la diffusion de la bactérie résistante parmi les individus de la population. Dans un contexte de décalage croissant entre la progression de la résistance bactérienne vers la multirésistance et les perspectives réduites de découvertes de nouvelles classes d'antibiotiques, la résistance bactérienne est apparue comme une menace pour la santé et donc un enjeu de sécurité sanitaire. Elle doit être considérée par tous les professionnels, au même titre que les infections nosocomiales, comme un enjeu de qualité des soins.



Nos travaux ont analysé le rôle de l'antibiothérapie et des facteurs liés à l'hôte et à l'hospitalisation sur le risque de colonisation et d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Les deux premières études publiées en 1999 ont évalué l'impact de l'antibiothérapie sur la résistance de souches cliniques d'*Escherichia coli*. Ces études ont permis de montrer une association significative entre l'exposition à un antibiotique et l'isolement d'une souche d'*E. coli* résistant. En particulier, l'exposition à une β -lactamine était associée à la résistance à l'amoxicilline et aux céphalosporines de 3^{ème} génération, et l'exposition aux fluoroquinolones et au cotrimoxazole était associée respectivement à la résistance à l'ofloxacine et au cotrimoxazole. Par ailleurs l'immunodépression était un autre facteur de risque associé à la résistance bactérienne, les patients cumulant l'exposition à un antibiotique et l'immunodépression étant les plus à risque d'être infectés par une souche résistante. A l'époque du recueil des données (1996), le taux de résistance à l'ofloxacine chez *E. coli* ne dépassait pas 4%. Or les taux de

résistance aux fluoroquinolones rapportés dans la littérature récente atteignent 10% pour les souches hospitalières (Lautenbach *et al.*, 2004). Dans ce contexte, l'évaluation des consommations des fluoroquinolones par type de service et la réalisation d'audit de conformité des prescriptions (ainsi que la réévaluation de l'antibiothérapie empirique à la 48^{ème} heure) dans les services présentant les taux de résistance et les consommations les plus élevées permettraient d'actualiser nos connaissances sur la résistance aux fluoroquinolones et de proposer des stratégies de contrôle de la diffusion de la résistance.

Nous avons ensuite analysé la colonisation gastro-intestinale de patients hospitalisés dans différents services du CHU de Nantes. L'objectif de cette étude prospective était de mesurer les taux de colonisation à l'admission et pendant l'hospitalisation par des bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, et de déterminer les facteurs de risque associés à la résistance à certains antibiotiques. Au cours de cette étude, aucune souche d'entérocoque résistant à la vancomycine n'a été détectée, alors que plusieurs alertes ont récemment été lancées par l'Institut national de Veille Sanitaire. L'étude de la consommation de la vancomycine dans les cinq services inclus dans notre étude de flore pourrait donner des éléments de réponse à cette observation. Dans un passé récent, des souches d'*Enterococcus faecium* avaient été isolées de selles de patients hospitalisés en Oncologie pédiatrique (1997) et en Soins Intensifs des Brûlés (1999) au CHU de Nantes. La consommation importante de vancomycine dans ces services avait alors été incriminée.

L'exposition aux antibiotiques variait selon les services mais aussi selon les familles d'antibiotiques. Ainsi les patients de réanimation et de médecine étaient les plus exposés à l'amoxicilline-acide clavulanique et aux céphalosporines de 3^{ème} génération, alors que les patients d'urologie et de soins de suite étaient les plus exposés aux fluoroquinolones. Les graphiques qui croisent la proportion de patients exposés à un antibiotique et le pourcentage de résistance à cet antibiotique au sein d'une espèce bactérienne montrent une relation entre l'exposition à l'amoxicilline-acide clavulanique et aux céphalosporines de 3^{ème} génération et la résistance à la ceftazidime. Ces observations graphiques sont confirmées par les modèles de régression logistique construits en analyse multivariée. L'utilisation de β -lactamines

entraîne des modifications de la flore digestive, induisant une augmentation des bactéries à Gram négatif résistantes comme les entérobactéries naturellement résistantes à l'amoxicilline et *Pseudomonas aeruginosa*. Ce «dommage collatéral» de l'antibiothérapie par amoxicilline-acide clavulanique est décrit dans deux articles (Sullivan *et al.*, 2001 et Edlund *et al.*, 2000) qui font la revue de la littérature des 30 dernières années sur l'impact des antibiotiques sur la flore digestive ou oropharyngée. De même, l'exposition à un gramme de ceftriaxone par voie intramusculaire chez 11 volontaires a montré des modifications spectaculaires de la flore intestinale avec diminution des bactéries à Gram négatif à des seuils indétectables, et une augmentation parallèle des entérocoques et des levures (De Vries-Hospers *et al.* 1991). Cavallaro *et al.* (1992) ont également étudié l'impact d'une dose unique de deux grammes de ceftriaxone administrée par voie intraveineuse sur la flore intestinale de 10 patients bénéficiant d'une chirurgie colorectale. Les entérobactéries de la flore digestive étaient fortement diminuées ou éliminées, avec peu de modifications des bactéries à Gram positif de la flore aérobie et de la flore anaérobie. La flore digestive était complètement revenue à son état initial au 28^{ème} jour.

Le principal mécanisme de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération observé dans nos études était l'hyperproduction de céphalosporinases, notamment dans les espèces bactériennes habituellement reconnues, comme *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii*. Très peu de souches produisant une β -lactamase à spectre étendu (β LSE) ont été isolées, alors que ce mécanisme de résistance semble prédominer actuellement, que ce soit en milieu communautaire (Calbo *et al.*, 2006) ou hospitalier (Pena *et al.*, 2006). Sur les 53 entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération isolées chez des patients hospitalisés au CHU de Nantes durant le 1^{er} trimestre 2006, 14 (26,4%) dont 12 chez *E. coli* présentaient un mécanisme de résistance par production de β LSE. Dans ce contexte épidémiologique, et devant des situations de diffusion de souches épidémiques, les études de flore digestive sont d'un apport précieux car elles permettent de connaître l'étendue du réservoir et de mesurer l'impact des stratégies de prévention mises en oeuvre.

Les fluoroquinolones sont pour leur part rapidement absorbées après une administration orale avec une diffusion tissulaire importante. Leur élimination varie selon les molécules, impliquant plusieurs mécanismes, rénal, hépatique et intestinal et de fortes concentrations d'antibiotiques sont retrouvées dans le tube digestif (Edlund *et al.*, 1988). De nouvelles quinolones ne semblent pas avoir d'impact majeur sur la flore digestive anaérobie. Cependant, les bactéries à Gram négatif aérobies, en particulier les entérobactéries, sont majoritairement sensibles aux quinolones et fortement éliminées de la flore pendant le traitement. Dans notre étude, l'exposition aux fluoroquinolones était un facteur de risque indépendant associé à la résistance à l'ofloxacine chez les entérobactéries, notamment dans le service d'urologie, fort consommateur de fluoroquinolones.

Cette étude de flore digestive a montré l'importance des taux de colonisation à *P. aeruginosa* acquis pendant l'hospitalisation, notamment dans les services de réanimation et de médecine. *P. aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans l'environnement, notamment dans l'alimentation (végétaux, légumes) mais aussi dans les champignons et haricots du commerce (Curran *et al.*, 2005). Cette présence dans l'alimentation expose la population au risque de colonisation, pouvant expliquer le taux de colonisation à l'admission observé dans notre étude (4,8%). L'étude de Corrêa *et al.* (1991) a montré que la salade proposée aux patients hospitalisés dans un service d'Oncologie d'un hôpital brésilien était à l'origine d'infections par des souches de *P. aeruginosa*. Dans notre étude, l'acquisition de la colonisation pour les patients négatifs à l'admission dans les services de réanimation se produisait rapidement au cours du séjour hospitalier. Cette colonisation était précédée d'une exposition aux antibiotiques modifiant la flore dominante du tube digestif, comme l'amoxicilline- acide clavulanique, très fréquemment prescrite dans les premiers jours d'hospitalisation dans ces services. D'autres antibiotiques, comme l'imipénème, étaient associés à la colonisation par des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème. Nous avons observé chez 4 patients initialement colonisés par une souche de *P. aeruginosa* sensible à l'imipénème, l'apparition *in vivo* sous traitement par imipénème de la résistance à cet antibiotique. Par ailleurs, deux patients ayant été initialement colonisés par une souche résistante à l'imipénème n'avaient pas reçu d'imipénème. Les souches résistantes de ces deux patients ont

perdu cette résistance au cours de l'hospitalisation, probablement par absence de pression aux antibiotiques, suggérant que la résistance à l'imipénème est réversible.

La pression de sélection aux antibiotiques n'est pas le seul élément expliquant la résistance bactérienne. D'autres facteurs, comme la transmission croisée et l'environnement, peuvent jouer un rôle, avec des pondérations selon les unités de soins et le type de patients. Dans notre étude, la diffusion de souches épidémiques de *P. aeruginosa* participait également à l'augmentation des taux de colonisation. Cette diffusion clonale, à partir de souches sélectionnées par l'antibiothérapie, peut survenir par transmission croisée chez des patients fragilisés, aux durées de séjours prolongées et bénéficiant de procédures invasives (cathéter veineux centraux,....). Ces situations ont déjà été décrites dans des services de réanimation d'établissements français (Berthelot *et al.*, 2001, Bertrand *et al.*, 2001). L'environnement, en particulier l'eau des robinets des chambres d'hospitalisation, peut être le réservoir de souches de *P. aeruginosa*, et être à l'origine de colonisations et d'infections. Cette exposition environnementale est facilement accessible à la prévention par la pose de filtres sur les robinets des chambres de réanimation (Trautmann *et al.*, 2005) ou par des actions de maintenance préventive des robinets par nettoyage-désinfection et par la restriction d'utilisation de ces points d'eau à la seule hygiène des mains des soignants (Berthelot *et al.*, 2001). Finalement, en service de réanimation en particulier, l'image qui semble la plus conforme à la réalité est celle d'une succession d'épidémies, sur un fond de cas sporadiques. Le caractère épidémique d'un clone dépendra, d'une part, de ses propriétés intrinsèques, notamment ses capacités d'adhérence et d'autre part, de la pression de sélection exercée par les antibiotiques. L'importance relative de l'origine endogène et de la transmission croisée n'apparaît donc pas très claire. Le faible nombre d'études caractérisant l'épidémiologie de *P. aeruginosa* en services de soins intensifs, à l'aide d'un marqueur épidémiologique performant limite la portée des observations. Les différences observées entre les services peuvent être expliquées par des différences de recrutement des patients et par des différences dans l'application de mesures générales d'hygiène permettant la maîtrise de la transmission croisée entre patients.

Les données disponibles à ce jour suggèrent donc une épidémiologie plus diverse que celle que l'on imaginait jusque récemment. Ainsi, *P. aeruginosa* est non seulement un pathogène opportuniste mais aussi un commensal opportuniste puisque certains patients sont des « porteurs sains » (4,8% dans notre étude à l'admission), ces patients pouvant développer ensuite une infection au cours de l'hospitalisation dans un service de réanimation. Par ailleurs, il existe donc une transmission manuportée de patient à patient dans les services à haut risque infectieux indépendante de l'exposition du patient à l'environnement hydrique. Enfin, on constate un rôle indiscutable de l'environnement hydrique dans le risque de colonisation hospitalière des patients, très variable selon les services, les établissements et les patients, les souches environnementales paraissant moins virulentes que les souches cliniques sélectionnées par l'antibiothérapie, souvent multirésistantes (Kang *et al.*, 2003).

Dans ce cadre, les méthodes génotypiques sont intéressantes au niveau local et permettent de confirmer des situations de transmission clonale épidémique par étude du polymorphisme de restriction de régions spécifiques de l'ADN, utilisant l'amplification génique ou surtout l'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN chromosomique (Talon *et al.*, 1996).



Gérer les résistances aux antibiotiques, en assurer la maîtrise, c'est d'abord les mesurer. La fréquence de la résistance, c'est à dire son évolution spatio-temporelle, est un indicateur de l'impact des mesures mises en place. Ainsi, en France le Comité Technique national des Infections Nosocomiales (CTIN, 1999) a publié des recommandations pour la maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. La prévention de la transmission croisée et la réduction de la pression de sélection, par un usage rationnel des antibiotiques, en sont les deux composantes essentielles. Cette politique est basée sur la surveillance de l'évolution de la fréquence des bactéries résistantes. Depuis, la lutte contre les bactéries résistantes est une priorité nationale qui implique l'adhésion de l'ensemble de la communauté hospitalière, médicale, paramédicale et administrative. Les mesures mises en place pour lutter contre les bactéries résistantes font partie des indicateurs d'évaluation des

pratiques professionnelles et des référentiels d'accréditation des établissements de santé. Cette surveillance a permis de développer nos capacités de détection rapide d'apparition et d'expansion de nouvelles résistances, de mesurer la résistance dans les espèces bactériennes impliquées dans les pathologies infectieuses, d'investiguer et de maîtriser les épidémies, d'améliorer le recueil des données, et de proposer des stratégies de contrôle (Lepelletier *et al.*, 2004).

Le CTIN et des Infections Liées aux Soins (CTINILS, 2004) a ajouté, dans son plan d'action 2005-2008, le suivi de la consommation des antibiotiques. En France, en DDD/1000 habitants/J, plus de 90% des antibiotiques vendus concernent la prescription de ville, et moins de 10% l'hôpital. Ce rapport s'inverse si, pour l'hôpital la quantité d'antibiotiques est rapportée au nombre de journées d'hospitalisation, soit plus de 90% à l'hôpital et moins de 10% en ville. Ceci suggère que si les quantités d'antibiotiques sont très importantes en ville, le potentiel sélectif est de loin le plus important à l'hôpital (Guillemot *et al.*, 2004).

La confrontation de ces indicateurs (résistance bactérienne et consommation des antibiotiques) pourrait permettre, au sein de chaque établissement, d'établir des mesures de contrôles. Ces mesures doivent intégrer le respect d'application des référentiels d'antibiothérapie pour éviter des taux élevés de résistance par pression de sélection dans les services consommant le plus d'antibiotiques. En effet, tous les patients exposés aux antibiotiques ne développent pas systématiquement de colonisation ou d'infection par des bactéries résistantes, probablement par le respect de prescription de molécules à faible pouvoir de modification de la flore, et par le respect des posologies et des durées de prescription.

A l'hôpital, limiter la transmission des bactéries résistantes fait référence aux mesures d'hygiène professionnelles destinées à contrôler les infections nosocomiales. Si l'efficacité de ces mesures est certaine, il n'en reste pas moins que l'exposition des patients hospitalisés crée un avantage sélectif des bactéries résistantes par rapport aux bactéries sensibles. Certains travaux ont ainsi observé que la maîtrise de l'usage des antibiotiques a un impact sur le risque d'infections nosocomiales liées à des agents pathogènes résistants. A ce titre, le suivi de la consommation d'antibiotiques à l'hôpital devient de fait un outil de la maîtrise de la

résistance, montrant aux professionnels de santé l'impact collectif de l'exposition aux antibiotiques.



Il faut cependant encore progresser, et mettre en œuvre, particulièrement en milieu hospitalier, des études épidémiologiques et bactériologiques. Ces études doivent tenir compte des antibiotiques utilisés, de l'exposition aux antibiotiques des populations de sujets hospitalisés, mais aussi des caractéristiques de leur séjour et de leurs modalités de prise en charge. Mais ces études sont difficiles à mettre en œuvre et leurs résultats dépendent étroitement de la qualité de la méthodologie. Le recueil rétrospectif des informations, réalisé au cours d'enquête cas-témoins, comme dans l'article 2 de notre recherche, ou lors d'enquête prospective comme dans l'article 1, mais où l'exposition mesurée a eu lieu avant l'hospitalisation, peut être biaisé, soit par le défaut de renseignement transcrit sur les dossiers médicaux, soit par le défaut de mémoire des patients interrogés. Dans l'article 1, les patients ayant été exposés aux antibiotiques dans le mois précédent leur hospitalisation ne se souvenaient pas de leur traitement, ou se souvenaient de la prise d'un traitement sans pouvoir affirmer qu'il s'agissait d'un antibiotique. Ainsi, peu de patients étaient capables de donner le nom de l'antibiotique reçu. De ce fait, la relation causale entre l'exposition à un antibiotique et la résistance bactérienne chez *E. coli* a été sous-estimée, et était probablement plus importante dans la réalité.

Les études de cohorte avec recueil prospectif des données sont plus lourdes à mettre en œuvre, plus coûteuses, avec des délais de publication de leurs résultats plus longs par rapport à des enquêtes de type cas-témoins. Cependant, elles permettent une analyse plus fiable de la relation entre l'exposition aux antibiotiques et la résistance bactérienne. Pour compléter les résultats des deux premières études réalisées sur des souches isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique, il nous a semblé intéressant d'approfondir nos connaissances sur l'impact de l'antibiothérapie sur la flore digestive de patients hospitalisés dans différents services du CHU de Nantes. Cette étude, financée dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique national (180 000 euros), a nécessité le recrutement et l'encadrement d'un Attaché de Recherche Clinique et d'un technicien de laboratoire pendant deux ans. Les études de flore digestive sont difficiles de réalisation et

déliçates d'interprétation. L'obtention répétée dans le temps et à intervalle défini de prélèvements de selles nécessite une organisation rigoureuse et participative des personnels des services inclus. Pour ces raisons, nous avons décidé d'analyser la flore digestive par écouvillonnage rectal et non par coproculture. L'inclusion des patients s'est fait service après service sur deux années (2000 à 2002), car il ne nous était pas possible de recueillir les écouvillons dans cinq services à la fois, et de les traiter au laboratoire en temps réel. De plus, tous les patients hospitalisés dans les cinq services sur les périodes d'étude avaient un écouvillonnage rectal à l'admission, mais seuls les patients hospitalisés plus de 48 heures étaient inclus dans l'étude et avaient un nouvel écouvillonnage à la 72^{ème} heure puis un par semaine jusqu'à la sortie du service. Cette méthode d'inclusion nous a contraint de gérer un nombre très important d'écouvillons qu'il fallait traiter rapidement après leur réalisation. Néanmoins, la plupart des études de flore réalisées en milieu hospitalier utilise la technique de l'écouvillonnage, même si cette analyse n'est pas quantitative. L'analyse est seulement qualitative, et l'interprétation des résultats dépend des bactéries étudiées et des milieux sélectifs choisis. De plus, l'analyse de la flore s'avère extrêmement délicate, car les souches de colonisation digestive peuvent varier dans le temps, et plusieurs bactéries résistantes de la même espèce peuvent être isolées dans le même prélèvement. La sélection d'une seule colonie pour l'analyse microbiologique repose donc sur un choix arbitraire. Par ailleurs, une seule souche par patient était retenue pour l'analyse des facteurs de risque afin d'éviter les doublons. L'étude de la flore digestive d'un patient de réanimation hospitalisé trois mois pendant la période d'étude illustre parfaitement cette difficulté d'analyse (**Annexe 2**). Vingt et un prélèvements rectaux ont été réalisés chez ce patient, identifiant plusieurs souches de *P. aeruginosa* de sérotype O6 (deux prélèvements) et O9 (un prélèvement), soit des souches polyagglutinables (4 prélèvements) avec parfois 4 prélèvements hebdomadaires successifs négatifs entre deux prélèvements positifs. Les souches de colonisation O9, O6 et les souches polyagglutinables présentaient le même pulsotype en électrophorèse en champ pulsé et étaient différentes de la souche polyagglutinable à l'origine d'une infection chez ce patient (souche appartenant au phénotype 2 SSRRR). L'analyse de la flore de ce patient est-elle le reflet de (i) la modification en temps réel de la flore, (ii) la capacité d'identification d'un sérotype par technique d'agglutination au laboratoire (des souches de sérotypes différents sont identiques en génotypie), (iii) la capacité de

détection de bactéries de la flore au-dessous d'un certain seuil (abaissé par une antibiothérapie efficace sur la souche), ou (iiii) de la sensibilité de l'écouvillon à récupérer la flore présente au niveau du rectum ?. Certaines études comme celle de Filius *et al.* (2005) analysent la flore digestive par écouvillonnage rectal pendant l'hospitalisation du patient et par prélèvement de selles lors des contrôles de flore à un et trois mois après la sortie de l'hôpital. Mais l'utilisation de deux méthodes au cours de la même étude pose le problème de l'interprétation des modifications de la flore digestive au cours du temps. L'utilisation de l'écouvillonnage rectal a néanmoins permis dans le cadre de nos recherches de systématiser une technique de prélèvement et d'obtenir une analyse de flore digestive sur l'ensemble des patients inclus et hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes.



En analyse multivariée, le choix du modèle est guidé par la nature des variables considérées (qualitatives ou quantitatives) et par la forme de leur distribution (normale ou non, dans le cas des variables quantitatives). En pratique, seul un petit nombre de modèles est utilisé en épidémiologie analytique dont le choix repose essentiellement sur la nature de la variable utilisée pour mesurer l'événement étudié. Le problème principal est donc la recherche du bon modèle. On peut alors soit choisir un modèle saturé qui est celui qui permet de représenter parfaitement les données car il a autant de coefficients que de catégories de sujets, mais alors chaque coefficient estimé a une grande variance en raison du grand nombre de variables (variables démographiques, cliniques, thérapeutiques par exemple), et surtout, il est fréquent que ce modèle soit difficile à interpréter. Soit choisir un sous-modèle, souvent plus facile à interpréter (uniquement les variables liées à l'exposition aux antibiotiques par exemple), mais peut laisser place à un biais de confusion résiduel ou à une inadéquation aux données par non prise en compte de certaines variables (Bouyer *et al.*, 1995). Le modèle de Cox est l'un des modèles multivariés auquel on fait appel pour l'analyse des enquêtes de cohorte, avec une durée de suivi qui diffère pour tous les sujets (parce que la date d'entrée dans la cohorte et/ou la date de survenue de l'événement étudié varie d'un sujet à l'autre). Il a initialement été étudié pour analyser des durées de survie, c'est à dire le délai jusqu'à la survenue du décès. Nous l'avons appliqué pour étudier le délai

d'acquisition de la colonisation digestive à *P. aeruginosa* au cours de l'hospitalisation. Les résultats de ce modèle permettent d'exprimer la relation entre l'incidence instantanée associée à la survenue de la colonisation et des différents facteurs qui peuvent être quantitatifs ou qualitatifs. Cependant, l'une des conditions d'utilisation de ces modèles est l'hypothèse que les risques instantanés (de colonisation) restent proportionnels au cours du temps, ce qui n'est pas vrai pour les risques de colonisation et d'infection.

Au cours de cette recherche, nous avons utilisé différentes stratégies d'analyse statistiques réalisant soit une analyse stratifiée à deux variables explicatives comme dans l'étude décrite dans l'article 1, et en développant un score de risque par le test du χ^2 de tendance (normalement utilisé pour multiplier l'effet conjoint des deux variables continues), soit une analyse graphique de survie par méthode de Kaplan-Meier, soit une analyse par modélisation multivariée. Pour cette dernière méthode, nous avons construit des modèles de régression logistique binaire ou des modèles de Cox en fonction de la nature de la variable. Ces différentes méthodes d'analyse multivariée nécessitent une approche statistique rigoureuse et consistent à modéliser la colonisation ou l'infection par une bactérie résistante. Dans ce cadre, le modèle de Cox, qui représente l'extension de la comparaison des courbes de survie si on prend en compte plusieurs variables, est intéressant et particulièrement adapté à l'étude de la survenue de la colonisation qui peut être variable selon les sujets au cours du temps.

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

La majorité des études de l'impact de l'antibiothérapie sur la résistance bactérienne a été réalisée à partir de souches cliniques chez des patients hospitalisés ou à partir de souches de colonisation digestive utilisant des modèles expérimentaux. L'émergence de la résistance provient de l'immense densité bactérienne de la flore intestinale, qui est aussi une source importante de bactéries pathogènes. L'équilibre de la flore digestive dominante est indispensable car il limite l'apparition d'agents pathogènes et prévient la colonisation par des bactéries résistantes. La connaissance de l'impact écologique d'un traitement antibiotique doit être à l'esprit de tous les prescripteurs dans un contexte de bénéfice collectif. Cependant, cette phase d'émergence de la résistance au sein des flores est indétectable en l'absence d'études spécifiques et ne se traduit bien souvent que lors de l'apparition d'une infection causée par une bactérie résistante. Dans ce contexte, l'étude du rôle de l'antibiothérapie et d'autres facteurs liés à l'hôte ou à l'hospitalisation sur la colonisation digestive, mise en œuvre dans le cadre d'un PHRC national et réalisée au CHU de Nantes sur une cohorte de plus de 900 patients hospitalisés dans cinq services différents sur une période de deux ans, témoigne de l'envergure et de l'originalité de notre démarche au-delà des contraintes méthodologiques d'analyse statistique et de la masse des données enregistrées.

L'intérêt de ce type d'étude est de pouvoir identifier le risque de résistance en fonction des services ayant une proportion importante de patients exposés à telle ou telle famille d'antibiotiques, et le niveau de résistance à ces antibiotiques. Nos travaux ont montré par ailleurs que d'autres facteurs peuvent être associés à la résistance, comme l'immunodépression et l'hospitalisation dans certains services, et que la diffusion de souches épidémiques par transmission croisée peut participer à l'augmentation des taux de résistance.

Cependant, l'importante quantité d'informations recueillies lors du PHRC, notamment pour l'analyse des facteurs de risque de colonisation à *P. aeruginosa*, devrait être davantage mise en valeur. En effet, peu d'études publiées sur les facteurs de risque de résistance ont été réalisées sur les flores digestives de patients hospitalisés dans différents services, n'incluant pas seulement des services de réanimation. Les études sont le plus souvent rétrospectives et analysent des échantillons de petite taille. Notre étude porte sur une cohorte de grande taille (195 patients colonisés par

P. aeruginosa parmi les 933 patients inclus dans l'étude) et devrait permettre d'apporter une analyse causale plus précise de la résistance, antibiotique par antibiotique, en tenant compte de la période d'exposition aux antibiotiques. L'analyse préliminaire, non encore publiée, des facteurs de risque de colonisation par une souche résistante à l'imipénème devrait inclure plusieurs paramètres afin d'améliorer la pertinence des résultats. En effet, cette approche méthodologique originale, a été établie à partir des publications de Harris *et al.* (2002) et Zavascki *et al.* (2005). Elle compare non seulement l'exposition aux antibiotiques mais aussi à d'autres facteurs liés à l'hôte ou l'hospitalisation chez les patients colonisés par une souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème à ceux chez les patients soit colonisés par une souche sensible à l'imipénème soit non colonisés par une souche de *P. aeruginosa*. Cependant, d'autres antibiotiques que l'imipénème devraient être introduits dans la modélisation de Cox, notamment les fluoroquinolones, et la ceftazidime. Ces données devraient être aussi mises en parallèle avec les résultats de la biologie moléculaire pour identifier la proportion de souches résistantes à l'imipénème issues de la transmission croisée chez les patients n'ayant pas reçu d'imipénème. Cette méthodologie d'analyse pourrait être appliquée à la résistance de *P. aeruginosa* à la ceftazidime. Cette démarche évaluerait précisément l'impact écologique de ces deux molécules et permettrait de donner des informations pertinentes aux cliniciens dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* lorsque les souches responsables d'infections sont sensibles aux deux antibiotiques, afin d'intégrer l'impact écologique dans le choix des traitements. Enfin, pour évaluer la part de la transmission croisée dans l'analyse de la résistance, des facteurs liés à la maîtrise de la diffusion des bactéries (hospitalisation dans une chambre à un seul lit, précautions barrières, ratio de personnel soignant par lits, consommation de solutions hydro-alcooliques) devraient être inclus dans les modélisations.

De plus, les données de la colonisation digestive et d'infections à *P. aeruginosa* acquises en réanimation recueillies au cours du PHRC devraient être croisées avec les données de surveillance de l'environnement hydrique au niveau des points d'eau réalisée régulièrement depuis 2002 dans les services de réanimations du CHU de Nantes. Cette analyse croisée permettrait de déterminer le rôle de l'environnement dans la colonisation digestive des patients hospitalisés plus de 48 heures et dans la

survenue d'infections de réanimations causées par les souches de l'environnement, comme le suggère notre étude préliminaire.

L'expérience acquise dans la réalisation de ce type d'étude de cohorte, incluant différentes stratégies d'analyse statistique, pourrait être utile également dans l'étude des facteurs de risque d'agents responsables d'infections nosocomiales comme *Acinetobacter baumannii*, ou d'autres pathogènes émergents communautaires mais diffusant à l'hôpital comme *E. coli* producteur de β LSE.

La commission des antibiotiques dans les établissements de santé doit promouvoir ce type d'étude en collaboration avec des équipes de recherche universitaires spécialisées en thérapeutique anti-infectieuse, incluant des microbiologistes, des hygiénistes, des épidémiologistes et des biostatisticiens. La commission des antibiotiques doit également faciliter la diffusion de ces résultats auprès des prescripteurs afin de porter à leur connaissance les variations de taux de résistance au sein de leur propre hôpital ou service et de mesurer l'impact écologique des antibiotiques qu'ils prescrivent. Différents projets pourraient s'inscrire dans cette dynamique, comme l'évaluation (qualitative et quantitative) et l'impact écologique de la prescription très fréquente d'amoxicilline-acide clavulanique et de fluoroquinolones dans certains services de notre établissement. Des techniques plus fondamentales d'analyse de la flore digestive (telle que Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis) pourraient également contribuer à identifier les flores (et donc les individus) les plus à même de sélectionner des bactéries résistantes sous un traitement antibiotique donné.

BIBLIOGRAPHIE

- Agence Nationale pour le Développement de l'Évaluation Médicale (ANDEM). Recommandations pour la Pratique Clinique – Le bon usage des antibiotiques à l'hôpital – Recommandations pour maîtriser le développement de la résistance bactérienne. Paris, Août 1996.
- Andremont A, Brun-Buisson C, Struelens M and all the workshop participants. Evaluating and predicting the ecologic impact of antibiotics. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(Suppl 5):1-6.
- Andremont A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* 2003;69:601-7.
- Andremont A, Cohen R, Drugeon H. How can antibiotics' capacity of selecting bacterial resistance be assessed. *Med Mal Infect.* 2004;34:109-111.
- Andremont A. Impact of antibiotherapy on intestinal ecosystem. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2000;19:395-402.
- Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12 (Suppl 1):16-23.
- Baquero F. Pneumococcal resistance to beta-lactam: a global geographic overview. *Microb Drug Resist.* 1995;1:115-20.
- Baquero F. Trends in antibiotics resistance of respiratory pathogens: an analysis and commentary on a collaborative surveillance study. *J Antimicrob Chemother.* 1996;38 (Suppl A):117-32.
- Bassett DC, Thompson SA, Page B. Neonatal infections with *Pseudomonas aeruginosa* associated with contaminated resuscitation equipment. *Lancet.* 1965;1:781-4.

- Bhavnani SM, Ambrose PG, Craig WA, Dudley MN, Jones RN. Outcomes evaluation of patients with ESBL- and non-ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species as defined by CLSI reference methods: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;54:231-6.
- Beigelman PM, Rantz LA. The clinical importance of coagulase-positive, penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 1950;242:353-8.
- Bennett PM, Chopra I. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:153-8.
- Bergmans DC, Bonten MJ, van Tiel FH, Gaillard CA, van der Geest S, Wilting RM, de Leeuw PW, Stobberingh EE. Cross-colonization with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax*. 1998;53:1053–1058.
- Bert F, Maubec E, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechovsky N. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J Hosp Infect*. 1998;39:53-62.
- Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospé R, Venet C, Carricajo A, Aubert G, Ros A, Dumont A, Lucht F, Zéni F, Auboyer C, Bertrand JC, Pozzeto B. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2001;27:503-512.
- Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, Hélias J. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med*. 2001;27:1263-8.
- Bertrand X, Blasco G, Belle E, Boillot A, Capellier G, Talon D. *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2003;22:505-9.

- Blanc DS, Nahimana I, Petignat C, Wenger A, Bille J, Fanciolo P. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004;30:1964-8.
- Boffi El Amari EB, Chamot E, Auckenthaler R, Pechere JC, Van Delden C. Influence of previous exposure to antibiotic therapy on the susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1859-64.
- Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respi Crit Care Med.* 1999;160:1212-9.
- Boukadida J, de Montalembert M, Gaillard JL, Gobin J, Grimont F, Girault D, Veron M, Berche P. Outbreak of gut colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in immunocompromised children undergoing total digestive decontamination: analysis by pulsed-field electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2068-71.
- Bouyer J, Hémon D, Cordier S, Derriennic F, Stücker I, Stengel B, Clavel J. *Epidémiologie. Principes et méthodes quantitatives.* Les Editions INSERM, Paris, 1995.
- Box GEP, Jenkins GM. *Time series analysis: forecasting and control*, 2nd edition. San Francisco, CA: Holden Day, 1976.
- Cailleaux V, Mulin B, Capellier G, Julliot MC, Thouverez M, Talon D. Epidemiological study of variations in beta-lactam antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in two intensive care units. *J Hosp Infect.* 1997;37:217-24.
- Calbo E, Romani V, Xercavins M, Gomez L, Vidal CG, Quintana S, Vila J, Garau J. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to

Escherichia coli harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:780-3.

- Cavallaro V, Catania V, Bonaccorso R, Mazzone S, Speciale A, Di Marco R, Blandino G, Caccamo F. Effect of a broad-spectrum cephalosporin on the oral and intestinal microflora in patients undergoing colorectal surgery. *J Chemother.* 1992;4:82-87.
- Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1379-82.
- Chen DK, McGeer A, De Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. Canadian Bacterial Surveillance Network. *N Engl J Med.* 1999;341:233-9.
- Circulaire n°2002-272 du 2 mai 2002 relative au bon usage des antibiotiques dans les établissements de santé et à la mise en place à titre expérimental de centres de conseil en antibiothérapie pour les médecins libéraux. <http://nosobase.chu-lyon.fr/legislation/antibiotique/ci020502.htm>.
- Comité Technique national des Infections Nosocomiales. Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité. Secrétariat d'Etat à la Santé et à l'action sociale 1999, Paris.
- Comité Technique national des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux soins. Circulaire n°599 du 13 décembre 2004 relative à la mise en oeuvre du programme national de lutte contre les infections nosocomiales 2005/2008 dans les établissements de santé.

- Corpet DE, Lumeau S, Corpet F. Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:535-40.
- Corpet DE. Antibiotic residues and drug resistance in human intestinal flora. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:587-93.
- Correa CM, Tibana A, Gontijo Filho PP. Vegetables as a source of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a University and Oncology Hospital of Rio de Janeiro. *J Hosp Infect.* 1991;18:301-6.
- Curran B, Morgan JA, Honeybourne D, Dowson CG. Commercial mushrooms and bean sprouts are a source of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5830-1.
- Damas P, Canivet JL, Ledoux D, Monchi M, Melin P, Nys M, De Mol P. Selection of resistance during sequential use of preferential antibiotic classes. *Intensive Care Med.* 2006;32:67-74.
- De La Cochetiere MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Dore J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5588-92.
- De Vries-Hospers HG, Tonk RHJ, van der Waaij. Effect of intramuscular ceftriaxone on aerobic oral and faecal flora of 11 healthy volunteers. *Scand J Infect Dis.* 1991;23:625-33.
- Declich S, Carter AO. Public health surveillance: historical origins, methods and evaluation. *Bull World Health Organ.* 1994;72:285-304.
- Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, Mahamat A, Daures JP, Sotto A. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J Hosp Infect.* 2004;57:209-16.

- Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens MJ. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1198-204.
- Dowell SF, Schwartz B. Resistant pneumococci: protecting patients through judicious use of antibiotics. *Am Fam Phys*. 1999;55:1647-54, 1657-8.
- Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52:11-7.
- Edlund C, Nord CE. Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46 (Suppl):41-48.
- Edlund C, Lindqvist L, Nord CE. Norfloxacin binds to human fecal material. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32:1869-74.
- Faye K. Current position in veterinary use of antibiotics: impact on antibiotic resistance of bacteria in animal and human health. *Antibiotiques*. 2005;7:45-52.
- Ferroni A, Nguyen L, Pron B, Quesne G, Brusset MC, Berche P. Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *J Hosp Infect*. 1998;39:301-7.
- Filius PM, Gyssens IC, Kershof IM, Roovers PJ, Ott A, Vulto AG, Verbrugh HA, Endtz HP. Colonization and resistance dynamics of gram-negative bacteria in patients during and after hospitalization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2879-86.
- Fournier PE and Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*. 2006;42:692-9.

- Fournier B, Gravel A, Hooper DC, Roy PH. Strength and regulation of the different promoters for chromosomal β -lactamases of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:850-5.
- Goettsch W, Bronzwaer SL, de Neeling AJ, Wale MC, Aubry-Damon H, Olsson-Liljequist B, Sprenger MJ, Degener JE. Standardization and quality assurance for antimicrobial resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* within the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:59-63.
- Gras-Le Guen C, Lepelletier D, Debillon T, Gournay V, Espaze E, Roze JC. Contamination of a milk bank pasteuriser causing a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88:434-5.
- Guillemot D, Carbon C, Balkau B, Geslin P, Lecoecur H, Vauzelle-Kervroedan F, Bouvenot G, Eschwege E. Low dosage and long treatment duration of beta-lactam: risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *JAMA*. 1998;279:365-70.
- Guillemot D. Impact of antibiotic use on the bacterial resistance to antibiotics in human populations. *Antibiotiques*. 2001;3:169-172.
- Guillemot D. How to evaluate and predict the epidemiologic impact of antibiotic use in humans: the pharmacoepidemiologic approach. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7;19-23.
- Guillemot D, Maugendre P, Chauvin C, sermet C. Consommation des antibiotiques en France. *BEH*. 2004;32-33:144-147.
- Goossens H. Spread of vancomycin-resistant *Enterococci*: difference between the United States and Europe. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998;19:546-551.

- Hagiage M. La flore intestinale: de l'équilibre au déséquilibre. Vigot Edition 1994.
- Harbarth S, Harris AD, Carmeli Y, Samore MH. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in Gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1462-8.
- Hardalo C, Edberg SC. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol*. 1997;23:47-75.
- Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y, Samore MH. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1055-61.
- Harris AD, Samore MH, Lipsitch M, Kaye KS, Perencevich E, Carmeli Y. Control-group selection importance in studies of antimicrobial resistance: examples applied to *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococci*, and *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1558-63.
- Harris AD, Smith D, Johnson JA, Bradham DD, Roghmann MC. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2002 ;34:340-5.
- Hawkey PM. Action against antibiotic resistance: no time to loose. *Lancet*. 1998;351:1298-9.
- Helfenstein U. Box-Jenkins modelling in medical research. *Stat methods Med Res*. 1996;5:3-22.
- Ho PL. For the Hong Kong intensive care unit antimicrobial resistance study (HK-ICARE) Group. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ceftazidime-resistant Gram-negative bacilli, and vancomycin-resistant

enterococci before and after intensive care unit admission. *Crit Care Med.* 2003;31:1175-82.

- Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, Miegerville AF, Donnio PY, Bugnon D, Potel G. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:857-64.
- Jarvis WR. Preventing the emergence of multidrug-resistant microorganisms through antimicrobial use controls: the complexity of the problem. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1996;17:490-5.
- Jevons P. Celbenin-resistant staphylococci. *Brit Med J.* 1961;1:124-125.
- Join-Lambert OF, Michea-Hamzehpour M, Kohler T, Chau F, Faurisson F, Dautrey S, Vissuzaine C, Carbon C, Pechere J. Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:571-6.
- Jones ME, Draghi DC, Karlowsky JA, Sahm DF, Bradley JS. Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from central nervous system specimens as reported by U.S. hospital laboratories from 2000 to 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;3:3.
- Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD, Kim EC, Choe KW. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2003;37:745-51.
- Krcmery V Jr, Trupl J, Kunova A, Spanik S, Ilavska I, Hel'pianska L, Bezakova I, Drgona L, Oravcova E, Studena M, Lacka J, Sevcikova L, Koren P, Kukuckova E, Stopkova K, Krupova I, Grausova S, Svec J. Imipenem-resistant

Ps. aeruginosa bacteraemia in cancer patients: risk factors, clinical features and outcome. *Bratisl Lek Listy*. 1996;97:647-51.

- Lartigue MF, Leflon-Guibout V, Poirel L, Nordmann P, Nicolas-Chanoine MH. Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from bla(TEM) genes and their relationship to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:4035-7.
- Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in *Enterococci*. *Clin Infect Dis*. 1997;24:545-556.
- Lee SC, Fung CP, Liu PY, Wang TC, See LC, Lee N, Chen SC, Shieh WB. Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999;20:205-7.
- Lefort A, Arthur M, Depardieu F. Expression of glycopeptide-resistance gene in response to vancomycin and teicoplanin in the cardiac vegetations of rabbits infected with VanB-type *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*. 2004;189:90-97.
- Leistevuo T, Osterblad M, Toivonen P, Kahra A, Lehtonen A, Huovinen P. Colonization of resistant faecal aerobic gram-negative bacilli among geriatric patients in hospital and the community. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;37:169-73.
- Leonard F, Andremont A, Leclercq B, Labia R, Tancrede C. Use of beta-lactamase-producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization. *J Infect Dis*. 1989;160:274-80.
- Lepelletier D, Richet H. Surveillance and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in French hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001;22:677-682.

- Lepelletier D, Perron S, Huguenin H, Picard M, Bemer P, Caillon J, Juvin ME, Drugeon HB. Which strategies follow from the surveillance of multidrug resistant bacteria (MRB) to strengthen the control of their spread?: a French experience. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25:162-4.
- Lester SC, del Pilar Pla M, Wang F, Perez Schael I, Jiang H, O'Brien TF. The carriage of *Escherichia coli* resistant to antimicrobial agents by healthy children in Boston, in Caracas, Venezuela, and in Qin Pu, China. *N Engl J Med.* 1990;323:285-9.
- Li XZ, Ma D, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:1742-52.
- Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557-84.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000;3:489-95.
- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002;34:634-40.
- Lopez-Lozano JM, Monnet DL, Yague A, Burgos A, Gonzalo N, Campillos P, Saez M. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14:21-31.
- Lorian V. The need for surveillance for antimicrobial resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995;16:638-41.
- Mahillon J. Transposons as gene haulers. *APMIS.* 1998;106:29-36.

- Mainardi JL, Gutmann L. Mécanismes de résistance des bactéries responsables d'infections nosocomiales. *Path Biol.* 1998;46:253-260.
- Mayr-Harting A. The acquisition of penicillin resistance by *Staphylococcus aureus*, strain Oxford. *J Gen Microbiol.* 1955;13:9-21.
- Meybeck A, Fantin B. De la colonie microbienne à l'infection chez l'homme: le cas de *Pseudomonas aeruginosa* , importance thérapeutique. *Antibiotiques.* 2004;6:241-8.
- McGowan JE Jr, Carlet J. Antimicrobial resistance: a worldwide problem for health care institutions. *Am J Infect Control.* 1998;26:541-3.
- Monnet DL, Archibald LK, Philipps L, Tenover FC, McGowan JE Jr, Gaynes RP. Antimicrobial use and resistance in eight US hospitals: complexities of analysis and modeling. Intensive care antimicrobial resistance epidemiology project and national nosocomial infections surveillance system hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998;19:388-94.
- Monnet DL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its relationship to antimicrobial use: possible implications for control. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998;19:552-9.
- Monnet DL. Toward multinational antimicrobial resistance surveillance systems in Europe. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;15:91–101.
- Monnet DL, Lopez-Lozano JM, Campillos P, Burgos A, Yague A, Gonzalo N. Making sense of antimicrobial use and resistance surveillance data: application of ARIMA and transfer function models. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7 Suppl 5:29-36.
- Monnet DL, MacKenzie FM, Lopez-Lozano JM, Beyaert A, Camacho M, Wilson R, Stuart D, Gould IM. Antimicrobial drug use and methicillin-resistant

Staphylococcus aureus, Aberdeen, 1996-2000. *Emerg Infect Dis.* 2004 10:1432-41.

- Muder RR, Brennen C, Drenning SD, Stout JE, Wagener MM. Multiply antibiotic-resistant gram-negative bacilli in a long-term-care facility: a case-control study of patient risk factors and prior antibiotic use. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18:809-13.
- Murray BE, Rensimer ER, DuPont HL. Emergence of high-level trimethoprim resistance in fecal *Escherichia coli* during oral administration of trimethoprim or trimethoprim--sulfamethoxazole. *N Engl J Med.* 1982;306:130-5.
- Murthy SK, Baltch AL, Smith RP, Desjardin EK, Hammer MC, Conroy JV, Michelsen PB. Oropharyngeal and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients. *J Clin Microbiol.* 1989;27:35-40.
- Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM; SHEA. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24:362-86.
- Nijssen S, Florijn A, Bonten MJ, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24:585-91.
- Pages JM. Bacterial porin and antibiotic susceptibility. *Med Sci.* 2004;20:346-51.
- Paramythitou E, Lucet JC, Timsit JF, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet JL, Belloc S, Kassis N, Karabinis A and Andremont A. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis.* 2004;38:670-7.

- Rahal JJ, Urban C, Segal-Maurer S. Nosocomial antibiotic resistance in multiple gram-negative species: experience at one hospital with squeezing the resistance balloon at multiple sites. *Clin Infect Dis.* 2002;34:499-503.
- Reuter S, Sigge A, Wiedeck H, Trautmann M. Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med.* 2002;30:2222-8.
- Rice L. Evolution and clinical importance of Extended-Spectrum β -Lactamases. *Chest.* 2001;119:391S-396S.
- Richard P, Delangle MH, Merrien D, Barille S, Reynaud A, Minozzi C, Richet H. Fluoroquinolone use and fluoroquinolones resistance: Is there an association ? *Clin Infect Dis.* 1994;19:54-59.
- Richard P, Le Floch R, Chamoux C, Pannier M, Espaze E, Richet H. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: rôle of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J Infect Dis.* 1994;170:377-83.
- Richard P, Delangle MH, Raffi F, Espaze E, Richet H. Impact of fluoroquinolone administration on the emergence of fluoroquinolone-resistant gram-negative bacilli from gastrointestinal flora. *Clin Infect Dis.* 2001;32:162-6.
- Richet H. Prise en charge d'une épidémie à *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2003;22:544-547.
- Richet HM, Mohammed J, McDonald LC, Jarvis WR. Building communication networks: international network for the study and prevention of emerging antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:319-22.
- Ridley M, Lynn R, Barrie D, Stead KC. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and hospital antibiotic policies. *Lancet.* 1970;1:230-3.

- Sanders P. Traitements thérapeutiques et antibiorésistance. *Point vet.* 1999;30:23-30.
- Shlaes DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S, McGowan JE Jr, Paul SM, Ruskin J, Stephen AM, Cummings J. The microbial contribution to human fecal mass. *J Med Microbiol.* 1980;13:45-46.
- Shooter RA, Gaya H, Cooke EM, Kumar P, Patel N, Parker MT, Thom BT, France DR. Food and medicaments as possible sources of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 1969;1:1227-9.
- Stelling JM, O'Brien TF. Surveillance of antimicrobial resistance: the WHONET program. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S157-68.
- Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:101-114.
- Talon D, Caillaux V, Thouverz M, *et al.* Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect.* 1996;32:135-45.
- Talon D, Mulin B, rouget C, Bailly P, Thouverez M, Viel JF. Risks and routes for ventilated-Associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:978-984.
- Talon D, Bertrand X. severe infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. In severe infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Editeurs: Hauser & Rello. *Kluwyver publisher.* 2004;p.115-125.
- Tancrède C, Azizi P, Raibaud P, Ducluzeau R. Conséquences de la destruction des barrières écologiques de la flore digestive par les antibiotiques. Perturbations entre l'hôte et les bactéries potentiellement pathogènes. *Med Mal Infect.* 1977;7:145-149.

- Tancredi C, Andremont A. Bactériémies d'origine intestinale chez les leucémiques en aplasie. *Med Mal Infect.* 1985;5:214-219.
- Tenover FC, Watanakunakorn C. Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America joint committee on the prevention of antimicrobial resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin Infect Dis.* 1997;25:584-99.
- Thacker SB. Surveillance. In: Gregg MB, ed. Field epidemiology. Oxford, Oxford University Press, 1996:16-32.
- The International *Pseudomonas aeruginosa* Typing Study Group. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1993;169:134-42.
- Thomson KS, Sanders WE, Sanders CC. USA resistance patterns among UTI pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 1994;33 (Suppl A):9-15.
- Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1627-34.
- Tiemersma EW, Monnet DL, Bruinsma N, Skov R, Monen JC, Grundmann H. *Staphylococcus aureus* bacteremia, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1798-9.
- Trautmann M, Michalsky T, Wiedeck H, Radosavljevic V, Ruhnke M. Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001;22:49-52.

- Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control*. 2005;33:S41-9.
- Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis*. 1997;25:1094-8.
- Urban C, Mariano N, Rahman N, Queenan AM, Montenegro D, Bush K, Rahal JJ. Detection of multiresistant ceftazidime-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates lacking TEM-26 after class restriction of cephalosporins. *Microb Drug Resist*. 2000;6:297-303.
- Vallés J, Mariscal D, Cortes P, Coll P, Villagra A, Diaz E, Artigas A, Rello J. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2004;30:1768-75.
- Van Ogtrop ML, Guiot HF, Mattie H, Van Furth R. Modulation of the intestinal flore of mice by parenteral treatment with broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35:976-982.
- Vatopoulos AC, Varvaresou E, Petridou E, et al. High rates of antibiotic resistance among normal fecal flora *Escherichia coli* in children from Greece. *Clin Microbiol Infect*. 1998;4:563-569.
- Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, Giauffret F, Ninin E, Nicolas F, Richet H. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med*. 1998;129:182-189.
- Weber SG, Gold HS, Hooper DC, Karchmer AW, Carmeli Y. Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1415-22.

- Weist K, Pollege K, Schulz I, Ruden H, Gastmeier P. How many nosocomial infections are associated with cross-transmission? A prospective cohort study in a surgical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002;23:127-32
- Yoshioka H, Fujita K, Maruyama S. Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in newborn infants. *J Hosp Infect.* 1983;4:41-4.
- Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. *J Hosp Infect.* 2005;59:96-101.

ANNEXES

Annexe 1. Caractéristiques des souches de 39 patients colonisés et infectés par *P. aeruginosa*, hospitalisés dans cinq services du CHU de Nantes entre 2000 et 2002.

	Colonisation		Infection		Similitude Génotype
	Date (délai d'isolement)	Sérotype et phénotype	Date	Sérotype et phénotype	
Patient 1	02/01/01 (16)	O11 RSRSS BANDE 66	05/01/01	NAG RSRSS	non réalisée
Patient 2	19/06/00 (26)	PAG SSSSS BANDE20	29/06/00	O9 SSSSS BANDE 21	NON
Patient 3	26/06/00 (4)	PAG SSRRR BANDE 19	04/07/00	O6 SSSRR	non réalisée
Patient 4	23/10/00 (7)	PAG RSSRS	19/10/00	O6 RSSRS	non réalisée
Patient 5	26/05/00 (1)	PAG SSSRR BANDE 37	24/05/00	PAG SSSRR BANDE 38	OUI
Patient 6	09/01/01 (6)	PAG SSSRS	12/01/01	O6 SSSRR	non réalisée
Patient 7	05/06/00 (10)	O10 SSSSS BANDE 39	03/06/00	PAG RSSSS BANDE 40	OUI
Patient 8	10/10/00 (4)	PAG SSSRS BANDE 3	06/10/00	O6 SSSRS BANDE 4	NON
Patient 11	08/03/01 (8)	PAG SSRRR BANDE 72	08/03/01	O6 RRRRR	non réalisée
Patient 12	11/12/00 (6)	O4 RRSRR	10/12/00	O4 RRSRR	non réalisée
Patient 13	14/12/00 (7)	O6 SSRRS	31/12/00	O6 SSSSS	non réalisée
Patient 14	26/12/00 (30)	PAG SSRSS BANDE 22	28/12/00	PAG RRRSS	non réalisée
Patient 15	15/05/01 (3)	O4 SSSRR	12/05/01	PAG SSSRR	non réalisée
Patient 16	13/03/01 (6)	O11 SSSRS	17/03/01	O11 SSSRS	non réalisée
Patient 17	08/01/01 (10)	PAG SSRRR BANDE 68	07/01/01	O6 SSSSS	non réalisée
Patient 18	02/05/00 (10)	O6 SSRRR BANDE 43	06/05/00	NAG SSRRR	non réalisée
Patient 19	02/03/01 (1)	O5 SSSSS	26/02/01	NAG -	non réalisée
Patient 20	27/03/01 (71)	O6 SSSRR	26/02/01	O9 SSSSR	non réalisée
Patient 21	18/09/00 (22)	PAG SSRRR	04/09/00	O6 RRRSR	non réalisée
Patient 22			14/01/01		NON
Patient 23	15/07/00 (4)	PAG SSSSS BANDE 27	21/07/00	PAG SSSSS BANDE 28	OUI
Patient 2	22/01/01 (4)	PAG SSRRR BANDE 7	28/01/01	O6 SSRRR BANDE 8	OUI
Patient 25	26/09/00 (6)	PAG SSSSS BANDE 33	29/09/00	NAG RRSSS BANDE 34	OUI
Patient 2	29/04/00 (3)	O6 SSSRS BANDE 13	06/05/00	PAG SSSRS BANDE 14	NON
Patient 27	16/10/00 (4)	PAG SSRRR BANDE 35	23/10/00	PAG RSSSS BANDE 36	non interprétable

Patient 28	11/12/00 (1)	O4 SSSSS BANDE 9	22/12/00	O4 SSSSS	non réalisée
Patient 29	19/12/00 (6)	PAG SSSRS	18/12/00	O8 SSSRS	non réalisée
Patient 30	18/07/00 (1)	O9 SSSSSS BANDE 25	19/07/00	?	non interprétable
Patient 31	19/03/01 (18)	PAG SSSRS BANDE 74	06/03/01	BANDE 26 O6 SSSRS	non réalisée
Patient 32	20/11/00 (16)	O12 RSSRR	07/12/00	O12 RSSRR	non réalisée
Patient 33	06/11/00 (5)	PAG SSRRR BANDE 44	14/11/00	O9 SSSSS	non réalisée
Patient 34	05/05/00 (12)	PAG SSSSS BANDE 15	25/06/00	PAG SSSSS BANDE 16	NON
Patient 35	29/01/01 (8)	PAG SSSRS BANDE 17	24/02/01	O9 SSSSS BANDE 18	NON
Patient 36	14/09/00 (5)	PAG SSSSS BANDE 83	21/09/00	PAG SSSSSS	non réalisée
Patient 37	28/08/00 (6)	NAG SSSSS BANDE 29	26/08/00	O9 SSSRR BANDE 30	NON
Patient 38	17/07/00 (6)	NAG SSSSSS BANDE 41	17/07/00	O16 SSSSSS	non interprétable
Patient 39	04/09/00 (2)	O3 SSSSS BANDE31	14/09/00	BANDE 42 PAG SSSSSS BANDE 32	non interprétable

Annexe 2. Cinétique de colonisation digestive par *Pseudomonas aeruginosa* d'un patient hospitalisé dans un service de réanimation.

DATE	SEROTYPE	TIC	CAZ	IPM	OFX	CIP
27/11/2000.....						
04/12/2000	PAG	I	S	S	R	R
12/12/2000.....						
19/12/2000	PAG	R	S	R	R	R
26/12/2000.....						
03/01/2001.....						
08/01/2001.....						
15/01/2001.....						
22/01/2001	O9	I	S	I	R	R*
29/01/2001.....						
05/02/2001.....						
12/02/2001.....						
19/02/2001.....						
26/02/2001.....						
05/03/2001	O6	S	S	S	R	R*
12/03/2001	PAG	R	R	R	R	R*
19/03/2001.....						
27/03/2001.....						
03/04/2001	O6	S	S	R	R	R*
10/04/2001.....						
17/04/2001.....						

* souches identiques en géotypage (bandes 105-108) mais différentes de la souche clinique (bande 104)

TITRE

Rôle de l'antibiothérapie et des facteurs liés à l'hôte et à l'hospitalisation sur le risque de colonisation et d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques

RESUME

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique, notamment en milieu hospitalier. De nombreuses données épidémiologiques établissent un lien entre antibiothérapie et infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Dans ce contexte, nous avons initialement réalisé deux études épidémiologiques sur des souches cliniques d' *Escherichia coli* dans le but de préciser le rôle de l'antibiothérapie mais aussi des facteurs liés à l'hôte et à l'hospitalisation. Ces études ont permis de montrer une association significative entre l'exposition à un antibiotique et l'immunodépression et l'isolement d'une souche résistante. En particulier, l'exposition à une β -lactamine était associée à la résistance à l'amoxicilline et aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et l'exposition aux fluoroquinolones et au cotrimoxazole était respectivement associée à la résistance à ces molécules. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une étude prospective de la flore digestive de 933 patients hospitalisés dans cinq services différents du CHU de Nantes, incluant des services de médecine, chirurgie et de réanimation dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique national. Aucun entérocoque résistant à la vancomycine n'a été détecté, 585 patients étaient colonisés par une entérobactérie résistante à l'amoxicilline, parmi lesquelles 9,4% étaient résistantes aux C3G et 4,8% résistantes à l'ofloxacine. Cent quatre vingt quinze patients étaient colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*, dont 23% à l'admission. L'exposition aux antibiotiques était impliquée dans chacune des résistances observées. L'antécédent d'hospitalisation ou l'hospitalisation dans certains services étaient également des facteurs de risque associés à l'isolement de souches résistantes. Les études de flore sont de réalisation et d'interprétation délicates mais s'avèrent intéressantes dans des situations épidémiques ou dans des contextes de surveillance épidémiologique ciblée.

TITLE

Impact of antibiotherapy and factors associated with host and hospitalisation on the risk of colonisation and infection caused by resistant bacteria

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a major health problem, especially in hospital-acquired infections. Many epidemiological data showed an association between antibiotic use and infection caused by antibiotic-resistant bacteria. To assess the impact of antibiotic use and other factors, we performed two epidemiological studies on clinical *Escherichia coli* strains isolated from hospital patients. We showed a significant association between antibiotic use and immunosuppression and infection caused by resistant *E. coli*. Previous use of β -lactamine was associated with amoxicillin- and third generation cephalosporin resistance, and previous use of fluoroquinolones and cotrimoxazole was associated with strains resistant to those antibiotics. In a second time, we performed a prospective study of the gut flora of 933 patients hospitalised in five different wards, including medicine and surgery wards and intensive-care units. No vancomycin-resistant *Enterococci* was isolated. 585 patients were colonised by an amoxicillin-resistant *Enterobacteriaceae*, with third generation cephalosporin- and ofloxacin resistance rates of 9.4% and 4.8%, respectively. One hundred and ninety five patients were colonized by *Pseudomonas aeruginosa* (23% on admission). Antibiotic use was implicated in all observed resistances. Previous hospital stay and hospitalisation in specific wards were also associated with antibiotic resistance. Studies of intestinal microflora are difficult to perform but are useful in epidemic situations and in target resistance surveillance programs.

DISCIPLINE Biologie Médecine Santé

MOTS-CLES Résistance bactérienne – Entérobactéries – *Pseudomonas aeruginosa* – Flore gastro-intestinale – Colonisation digestive – Facteurs de risque

UFR Médecine, Université de Nantes
Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire, Institut de Biologie, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01.