



HAL
open science

Mécanismes de dissémination des Entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi en médecine intensive réanimation

Renaud Prével

► **To cite this version:**

Renaud Prével. Mécanismes de dissémination des Entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi en médecine intensive réanimation. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0315 . tel-03473742

HAL Id: tel-03473742

<https://theses.hal.science/tel-03473742>

Submitted on 10 Dec 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE

Par Renaud PREVEL, né le 14/07/1989 à Rueil-Malmaison (92)

**Mécanismes de dissémination des Entérobactéries productrices de
bêta-lactamase à spectre élargi en Médecine Intensive Réanimation**

Sous la direction du Pr Didier GRUSON

Soutenue le 09 décembre 2019

Membres du jury

Monsieur le Professeur Jean Reignier (PU-PH)	Président
Monsieur le Professeur Michel Dion (PR)	Rapporteur
Monsieur le Professeur Damien Roux (PU-PH)	Rapporteur
Madame le Docteur Emilie Bessède (MCU-PH)	Examineur
Monsieur le Professeur Didier Gruson (PU-PH)	Directeur

Mécanismes de dissémination des Entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi en médecine intensive réanimation

Introduction : En Europe, les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (E-BLSE) sont les principales bactéries pourvoyeuses d'antibiorésistance, à l'origine de difficultés thérapeutiques, notamment en réanimation. L'étude des mécanismes de dissémination de ces E-BLSE comprenant les mécanismes de transmission de colonisation et de lien colonisation-infection est nécessaire afin d'en maîtriser la diffusion. Le premier objectif de cette thèse est d'étudier le rôle des disséminations clonale et plasmidique ainsi que celui du microbiote digestif dans la dissémination de la colonisation digestive à E-BLSE et dans le lien-colonisation infection.

Matériels et Méthodes : Les isolats E-BLSE colonisant et infectant les patients admis en service de Médecine Intensive Réanimation de l'hôpital Pellegrin entre janvier et mai 2015 ont été collectés. L'analyse de la dissémination clonale a été réalisée par *pulsed-field gel electrophoresis*. L'analyse de la dissémination plasmidique a été réalisée par détermination *polymerase-chain reaction* des groupes d'incompatibilité plasmidique. L'analyse du microbiote a été faite à partir du recueil de selles par écouvillon rectal. Les régions V3-V4 de la région codant pour l'ARN16S ribosomal et la région ITS2 ont été séquencées. L'assignation a été faite suivant le *pipe-line* DADA-2 et les analyses à l'aide du logiciel R version 3.6.0.

Résultats : Sur 608 patients dépistés, 55 (9%) étaient porteurs rectaux d'une E-BLSE, 49 (8%) dès leur admission et 6 (1%) l'ont acquise en réanimation. Sur ces 6 patients, un seul cas de dissémination clonale a été retrouvé. Sur ces 55 patients colonisés, 38 ont été infectés dont seulement 6 (16%) par une E-BLSE, par le même clone que celui colonisant. Le fait d'être porteur rectal d'E-BLSE avait une valeur prédictive positive de 40% et une valeur prédictive négative de 100% pour le fait d'avoir une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique. Les plasmides associés aux gènes codant pour les enzymes BLSE étaient les plasmides classiquement décrits sans qu'il ne soit trouvé de plasmide hégémonique. L'influence des plasmides sur le lien colonisation-infection n'a pas été étudiée. Lors de l'étude du microbiote intestinal, il n'y avait pas de différence observée de diversité alpha ni de diversité bêta entre les bactériotes et les mycobiotes des patients colonisés à E-BLSE et ceux des patients non colonisés. Il n'y avait pas non plus de différence de diversité alpha ni de diversité bêta entre les bactériotes des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE. En revanche, il existait une différence statistiquement significative de diversité alpha entre les mycobiotes des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE.

Conclusion : La dissémination clonale semble avoir un rôle limité dans la dissémination de la colonisation digestive à E-BLSE mais participer au lien entre colonisation et infection. Notre étude ne permet pas de conclure sur le rôle de la dissémination plasmidique. Enfin, des altérations qualitatives des bactériotes et des mycobiotes digestifs sont associées à la colonisation par une E-BLSE. Le passage de la colonisation à l'infection par une E-BLSE pourrait s'expliquer par l'ajout d'altérations quantitatives des bactériotes et mycobiotes digestifs. De futures études incluant de plus nombreux patients et analysant les microbiotes associés à la colonisation par les différentes espèces d'E-BLSE permettrait de préciser les modifications du microbiote associées à la colonisation et aux infections à E-BLSE. En cas de résultat significatif, des tentatives de décolonisation digestive d'E-BLSE pourraient être menées par des probiotiques « sur mesure ».

Mots clés : antibiorésistance, bêta-lactamase à spectre élargi, plasmides, microbiote intestinal

Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriales* mechanisms of dissemination in medical ICU

Introduction: Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriales* (ESBL-E) are a leading cause of antimicrobial resistance dissemination in Europe. ESBL-E can lead to inadequate antimicrobial treatment, especially in intensive care units (ICU). A better understanding of ESBL-E mechanisms of dissemination, including colonization diffusion and the link between colonization and infection, is needed to improve ESBL-E containment. The aims of this work are to investigate the roles of clonal and plasmidic disseminations and of gut microbiota in ESBL-E spread.

Materials and Methods: ESBL-E isolates from ICU patients between January and May 2015 were collected. Clonal dissemination was assessed by mean of pulsed-field gel electrophoresis and plasmidic one by mean of incompatibility groups determination by polymerase-chain reaction. Microbiota analysis were performed on rectal swabs by 16SrRNA coding gene and ITS2 coding gene sequencing. Assignment was performed thanks to DADA-2 pipe-line and statistical analysis on Phyloseq R package (version 3.6.0).

Results: Among 508 screened patients, 55 (8%) were ESBL-E fecal carriers, 49 (8%) imported- and 6 (1%) acquired-fecal carriage. Among those 6 patients who acquired ESBL-E fecal carriage in ICU, only one case of cross-transmission was found. Among those 55 ESBL-E fecal carriers, 38 were infected during their stay in ICU but only 6 (16%) had a subsequent ESBL-E infection. To be an ESBL-E fecal carrier had a positive predictive value of 40% and a negative predictive value of 100% to have a subsequent ESBL-E ventilator-associated pneumonia. ESBL genes carrying plasmids were those usually described and we did not find any hegemonic plasmid. The plasmidic impact on the link between ESBL-E colonization and subsequent ESBL-E infection was not assessed. We did not find any difference regarding gut bacteriobiota and mycobiota alpha and beta diversities based on ESBL-E carriage status and regarding gut bacteriobiota based on subsequent ESBL-E infection. We found a statistically significant difference regarding gut mycobiota alpha diversity but not beta diversity based on subsequent ESBL-E infection.

Conclusion: Clonal dissemination seems to be involved in the link between ESBL-E carriage and subsequent ESBL-E infection but poorly in ESBL-E cross-transmission. Our results do not permit to draw any conclusion regarding plasmidic dissemination. Qualitative alterations of gut microbiota could participate to ESBL-E fecal carriage but further studies are needed to better understand the underlying mechanisms. Further quantitative alterations seem to be associated with the occurrence of subsequent ESBL-E infections but, once again, further studies are needed to decipher the causative mechanisms. These studies could pave the way to tailored probiotics to eradicate ESBL-E fecal carriage.

Keywords: antimicrobial resistance, extended-spectrum beta-lactamase, plasmids, microbiota

Remerciements

Monsieur le Professeur Jean Reignier,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci d'avoir accepté de faire le déplacement pour présider ce jury et d'apporter votre expertise de la réanimation à la discussion lors de cette soutenance. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Michel Dion,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci d'avoir accepté de faire le déplacement pour juger ce travail et d'apporter votre expertise de l'impact du microbiote sur la dissémination de l'antibiorésistance aux discussions lors de cette soutenance. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Damien Roux,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci d'avoir accepté de faire le déplacement pour juger ce travail et d'apporter votre expertise de la réanimation et plus particulièrement de l'intérêt de l'étude du microbiote pour la prise en charge des patients. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Madame le Docteur Emilie Bessède,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci beaucoup d'avoir accepté de venir discuter microbiote. J'espère que nous pourrons continuer de nous entraider dans les méandres du microbiote et d'interagir avec plaisir pour la prise en charge des patients. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Didier Gruson,

Vous me faites l'honneur de diriger ce travail. Merci de ton accompagnement depuis ces quatre années. La thèse n'a pas toujours été un long fleuve tranquille mais elle m'a permis de profiter de tes connaissances encyclopédiques concernant l'antibiorésistance. Elle m'a également permis d'apprécier ton écoute et ton soutien et je suis conscient de la chance que j'ai eue. Je sais qu'il est encore difficile de faire le deuil de certains sujets mais je te remercie de m'avoir permis de me lancer et j'espère que cela permettra de prendre un nouveau départ et d'instaurer une nouvelle dynamique de recherche au sein du service. J'espère avoir la chance de continuer à apprendre à tes côtés.

Je souhaite remercier l'équipe Variabilité, répllication et mobilité des génomes bactériens et viraux ainsi que la cellule Aquitaine Microbiologie de l'UMR CNRS 5234 de m'avoir accueilli lors de mes 2 premières années de thèse. Un merci tout particulier aux VIH Christina, Paul, Eric et Delphine pour la bonne humeur, le soutien et notre regretté Craspouille !

Je souhaite également remercier l'équipe du centre de bioinformatique de Bordeaux qui a réalisé l'assemblage plasmidique. Je suis navré que le gène BLSE retrouvé n'ait pas été plus exotique.

Je voudrais également remercier le CHU de Bordeaux qui a financé cette thèse grâce au programme MD-PhD et à l'année recherche.

Un grand merci à l'équipe Inserm 1045 et au Pr Berger de m'avoir recueilli pour ma 3^{ème} année ! Merci au Pr Marthan de m'avoir aiguillé vers Didier tout jeune interne (merci M. D !) et d'avoir gardé un œil sur moi pour me guider dans les méandres des financements de thèse. Merci Isabelle de ta patience et de m'avoir laissé finir et faire le tri dans tous les projets accumulés. J'espère être plus utile au labo dans les années à venir ! Merci aussi à toute l'équipe : Céline, Elise, Marilyne, Paul, Marielle, Pauline, Guillaume, Benoit et Thomas pour votre bonne humeur au quotidien, la bonne ambiance qui règne dans le labo et le fait de savoir qu'il y a toujours quelqu'un qui a une solution.

Voici le tour du loft de l'ambiance : Juliette, Hannah, Edmée, Ophélie, Alexis et Fabien. Merci pour ces heures de rire, d'entraide et les litres de bière. Heureusement que Juliette est là pour faire régner l'ordre !! Alexis, attention aux grenades !

L'apport du « Myco-microbiota group » a également été précieux autour de Laurence et Thierry. Merci d'avoir organisé ces moments de réflexion et de nous aider à nous lancer dans cette aventure du microbiote. Merci Louise-Eva pour ton regard précieux sur nos errements en micro-mycobiote. Bravo Thomas d'avoir été le pionnier, je ne sais toujours pas comment tu as réussi à t'en sortir, probablement grâce à ta curiosité et ta persévérance qui sont sans faille. J'espère qu'on trouvera la possibilité de continuer nos échanges. Le meilleur pour la fin, je ne pourrai jamais assez te remercier, Raph. S'il y a une partie microbiote dans cette thèse, c'est surtout grâce à toi entre l'invitation aux réunions microbiote, les discussions sur l'élaboration des protocoles et encore pire la bioinfo ! Je trouve qu'on forme plutôt une bonne équipe, pourvu que ça dure !

Enfin, merci Maëlig d'avoir accepté de tenter une première approche du virobiote pulmonaire. Je sais que ce ne fut pas de tout repos.

Merci également à « l'autre équipe » microbiote bordelaise. Merci à Claire d'avoir été, en plus d'une super directrice de thèse de médecine, une rapporteure de mi-thèse compréhensive et au Pr Lehours d'avoir accepté de discuter de mes résultats et de la façon de conduire ma thèse. Merci également au Dr Katia Boniface qui a joué le rôle de tutrice de thèse.

Je suis également reconnaissant au Pr Blanco de lancer une thématique « Sepsis » au sein d'Immunoconcept. J'espère que le petit groupe avec Julien, Maria, Isabelle, Didier et Antoine grandira et que les projets, qui s'annoncent passionnants, se concrétiseront rapidement. Bienvenue à Laure qui sera la première à s'y lancer.

Un grand merci à Thomas de m'avoir attiré dans l'aventure ESS avec Isabelle, Marie-Edith et toute l'équipe. C'est un vrai plaisir de voir autant de jeunes médecins, pharmaciens et dentistes enthousiastes et motivés par la recherche même si cela donne un petit coup de vieux. Nous avons eu la chance d'avoir une première promo du tonnerre, espérons qu'elle en annonce plein d'autres ! Même si l'ESS est avant tout faite pour les plus jeunes, j'y apprendrais énormément.

Merci également à toute l'équipe médicale et paramédicale de réa med sans qui aucun patient ne serait inclus, aucun prélèvement fait et donc aucune étude possible. Merci de votre intérêt pour la recherche et de votre aide pour mon travail de recherche en plus de tout ce que j'apprends humainement et médicalement avec vous. Benjamin, un merci tout particulier pour le soutien psy au milieu de la thèse quand le bateau tanguait sérieusement.

Je voudrais également remercier le Pr RJ Wilkinson et toute l'équipe de l'IIDMM de Cape Town d'avoir accepté le petit « frenchie » en stage de M2. Merci Graham de m'avoir initié à la médecine dans les townships et les TB clinics, d'avoir un peu parlé français grâce à ta femme quand je n'en pouvais plus de l'anglais et bravo pour le New England !

J'ai eu la chance d'être initié à la recherche au sein de l'équipe du Pr Stanislas Lyonnet à Necker. Merci de votre accueil et de votre bienveillance lors de mes premiers pas. Merci infiniment à Sabina Benko et Anna Pelet de m'avoir encadré de si près pour ces débuts.

Je voudrais également remercier André Dumoulin qui a été une tutrice bienveillante lors de mes années à l'ENS.

Pour finir par le commencement, je voudrais remercier l'équipe du programme Médecine-Sciences de Paris Descartes qui m'a appâté et donné le goût de la recherche. Merci M. Chottard de votre passion pour la recherche et de votre engouement et votre persévérance à la transmettre. Enfin merci M. Amblard de votre patience alors que je suis nul en Physique mais surtout d'avoir profondément chamboulé ma façon de voir la Bio. La vie serait faite d'état stationnaire hors équilibre et l'équilibre correspondrait à la mort. J'ai redécouvert cela récemment en lisant les travaux d'Edgar Morin sur l'entropie et la complexité des systèmes ouverts pour cette thèse. Vous aviez semé la graine il y a bien longtemps !

A ma Famille et mes Amis,

A Margaux,

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	9
Liste des figures	13
Liste des tableaux	16
Liste des abréviations	18
Valorisation scientifiques	23
Introduction	26
1) Entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi	27
1.1 Entérobactéries	27
1.1.1 Taxonomie et phylogénie	27
1.1.2 Structure et caractères culturels	27
1.1.3 Habitat et pathogénicité	28
1.1.4 <i>Escherichia coli</i>	28
1.1.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
1.1.6 <i>Enterobacter spp.</i>	30
1.2 Résistance aux bêta-lactamines	30
1.2.1 Les bêta-lactamines	30
1.2.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes	31
1.2.3 Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques	33
1.2.4 Distinction entre résistance naturelle et résistance acquise	33
1.2.5 Résistance naturelle aux bêta-lactamines	35
1.2.6 Résistance acquise aux bêta-lactamines : les bêta-lactamases ..	36
1.2.7 Résistance acquise des entérobactéries aux β -lactamines : place	
des β -lactamases à spectre élargi	37
1.2.8 Associations de mécanisme de résistance	43
1.3 Dissémination des E-BLSE	44
1.3.1 Dissémination plasmidique	44
1.3.2 Dissémination clonale	48
1.3.3 Dissémination en réanimation et mesures de prévention	50
1.3.4 Autres mesures de maîtrise de la résistance aux antibiotiques :	
maîtrise de l'antibiothérapie	50
1.3.5 Dissémination environnementale	54
1.3.6 Dissémination au sein d'un autre environnement : le microbiote	
.....	57
2) Microbiote et dissémination des E-BLSE	58
2.1 Généralités sur le microbiote intestinal	58
2.2 Rôles physiologiques du microbiote intestinal	59
2.3 Notion de dysbiose	60
2.4 Facteurs de variabilité du microbiote intestinal	61
2.5 Microbiote et réanimation	62
2.5.1 Impact de la réanimation sur le microbiote intestinal	62
2.5.2 Microbiotes et inflammation en réanimation	63
2.5.3 Microbiotes et résistance à la colonisation	64
2.6 Modulation du microbiote	66
2.6.1 Antibiothérapie	66
2.6.2 Transplantation fécale	66
2.6.3 Autres approches	67
Objectifs de la thèse	70

Matériels et Méthodes	72
1) Dépistage des E-BLSE en réanimation	73
1.1. Inclusion des patients et définitions	73
1.2. Procédures de dépistage	74
1.3. Identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF	75
1.4. Détection de l'activité BLSE par le test MAST® AMPC & ESBL DETECTION DISCS	77
2) Caractérisation des gènes de résistance des isolats E-BLSE	78
2.1. Antibiogramme en milieu gélosé par diffusion	78
2.2. Détermination des CMI par méthode E-test	79
2.3. Identification moléculaire des gènes codant les β -lactamases à spectre élargi	80
2.3.1. Extraction d'ADN génomique par technique dite « SET »	80
2.3.2. Réaction d'amplification par PCR	81
2.3.3. Séquençage des gènes codant les BLSE	82
3) Etude de la dissémination clonale par électrophorèse en champ pulsé	83
4) Etude du lien colonisation-infection	84
4.1. Identification des patients infectés à E-BLSE	84
4.2. Statistiques	84
4.3. Ethique pour l'étude de la dissémination clonale et plasmidique	84
5) Etude de la dissémination plasmidique par détermination des groupes d'incompatibilité plasmidique	85
5.1. Extraction plasmidique par technique « Miniscreen »	85
5.2. Conjugaison	86
5.3. Transformation	87
5.4. Identification moléculaire des groupes d'incompatibilité plasmidique	87
5.5. Révélation des produits d'amplification par le BET	88
5.6. Séquençage d'un plasmide et analyse bioinformatique	88
6) Etude de l'association entre colonisation digestive à E-BLSE et microbiote	89
6.1. Sélection des patients	89
6.2. Prélèvements et stockage	89
6.3. Extraction	89
6.4. Préparation de la librairie et séquençage	89
6.5. Analyse bioinformatique	90
6.6. Ethique pour l'étude des microbiotes digestifs associés à la colonisation digestive à E-BLSE	90
Résultats	91
1) Dissémination clonale inter et intra patient des E-BLSE	92
2) Dissémination plasmidique	100
3) Comparaison des microbiotes digestifs des patients colonisés à E-BLSE à ceux non colonisés à E-BLSE	104
3.1. Comparaison des bactériotes	104
3.2. Comparaison des mycobiotes	107
4) Comparaison des microbiotes digestifs des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE	110
4.1. Comparaison des bactériotes	110
4.2. Comparaison des mycobiotes	112

Discussion	114
1) Disséminations clonale et plasmidique des gènes codant pour les enzymes BLSE ...	115
2) Lien colonisation-infection chez les patients colonisés à E-BLSE	117
3) Comparaison des microbiotes digestifs des patients colonisés à E-BLSE à ceux non colonisés à E-BLSE	120
4) Comparaison des microbiotes digestifs des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE	122
5) Etude du microbiote : limites générales	124
5.1. Limites techniques de l'étude du microbiote	124
5.2. Limites conceptuelles de l'étude du microbiote	128
5.2.1. Présence ou fonction ?	128
5.2.2. Intégration en multi-omique	130
5.2.3. Corrélation ou causalité ?	131
Conclusion	132
Bibliographie	135
Annexes	160
Annexe 1	161
Annexe 2	162
Annexe 3	175
Annexe 4	179

Liste des figures

Figure 1. Principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries	33
Figure 2. Principales bêta-lactamases retrouvées chez les Entérobactéries réparties selon la classification d'Ambler	37
Figure 3. Arbre phylogénétique présentant les distances entre les différents groupes CTX-M	41
Figure 4 : Principaux réservoirs d'E-BLSE participant à la dissémination globale des E-BLSE	55
Figure 5. Ecosystème intégré aboutissant à la dissémination de l'antibiorésistance et illustrant l'importance du concept « One Health »	56
Figure 6 : Prise en compte des concepts « One Health » and « Global Health » dans la lutte contre l'antibiorésistance	57
Figure 7 : Représentation schématique du “paysage de stabilité” de la composition du microbiote intestinal	61
Figure 8 : Méthode pour l'identification des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF à partir d'une culture bactérienne	76
Figure 9 : Schéma général du fonctionnement du spectromètre de masse MALDI-TOF	76
Figure 10 : AntibioGramme des entérobactéries selon les recommandations EUCAST	78
Figure 11 : Détermination de la CMI au ceftolozane-tazobactam par bandelette E-test	79
Figure 12 : Gel de migration révélant les amplicons obtenus à partir des amorces TEM	82
Figure 13 : Distribution de la taille des contigs obtenus après assemblage à l'aide des différents logiciels utilisés	101
Figure 14 : Alignement des assemblages obtenus comparés à la séquence de référence	102
Figure 15 : Analyse de la séquence protidique indiquant la substitution d'un acide aminé alanine par une valine en position 226	103
Figure 16 : cartographie plasmidique avec identification du gène <i>bla_{CTX-M-14}</i>	103
Figure 17 : Comparaison des diversités alpha des bactériobiotés digestifs en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE	104
Figure 18 : Analyse de la diversité beta des bactériobiotés digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE.....	105
Figure 19 : Comparaison des diversités alpha des bactériobiotés digestifs en fonction de l'espèce d'E-BLSE responsable de la colonisation digestive	105
Figure 20 : Comparaison par analyse LefSe des ASV bactériens associés, au sein des bactériobiotés digestifs, à la colonisation digestive à <i>E. coli</i> BLSE	106
Figure 21 : Comparaison des diversités alpha des bactériobiotés digestifs en fonction de la colonisation digestive à <i>K. pneumoniae</i> BLSE	106
Figure 22 : Comparaison par analyse LefSe des ASV bactériens associés, au sein des bactériobiotés digestifs, à la colonisation digestive à <i>K. pneumoniae</i> BLSE	107
Figure 23 : Comparaison des diversités alpha des mycobiotés digestifs en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE	108
Figure 24 : Analyse de la diversité beta des mycobiotés digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE	108
Figure 25 : Comparaison par analyse LefSe des ASV fongiques associés, au sein des mycobiotés digestifs, à la colonisation digestive par <i>E. coli</i> BLSE	109
Figure 26 : Comparaison par analyse LefSe des ASV fongiques associés, au sein des mycobiotés digestifs, à la colonisation digestive par <i>K. pneumoniae</i> BLSE	109

Figure 27 : Comparaison des diversités alpha des bactériotes digestifs en fonction du fait d’être infecté par <i>E. coli</i> BLSE en étant colonisé au niveau digestif par <i>E. coli</i> BLSE	110
Figure 28 : Analyse de la diversité beta des bactériotes digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction du fait d’être infecté par <i>E. coli</i> BLSE en étant colonisé au niveau digestif par <i>E. coli</i> BLSE	111
Figure 29 : Comparaison par analyse LefSe des des ASV bactériens associés, au sein des bactériotes digestifs, à la survenue d’infection par une E-BLSE chez les patients colonisés par une E-BLSE	111
Figure 30 : Comparaison des diversités alpha des mycobiotes digestifs en fonction du fait d’être infecté par une E-BLSE en étant colonisé au niveau digestif par une E-BLSE	112
Figure 31 : Analyse de la diversité beta des mycobiotes digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction du fait d’être infecté par une E-BLSE en étant colonisé au niveau digestif par une E-BLSE	112
Figure 32 : Comparaison par analyse LefSe des des ASV fongiques associés, au sein des mycobiotes digestifs, à la survenue d’infection par une E-BLSE chez les patients colonisés par une E-BLSE	113
Figure 33 : Comparaison des diversités des bactério digestifs en fonction du fait d’être infecté par <i>E. coli</i> BLSE en étant colonisé au niveau digestif par <i>E. coli</i> BLSE	113

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition des entérobactéries en fonction de leur profil de résistance naturelle ...	35
Tableau 2. Groupe d'incompatibilité plasmidique des plasmides portant les gènes codant pour des enzymes BLSE au sein des souches isolées en portage digestif en réanimation	100
Tableau 3. Résultats de l'assemblage du plasmide	101

Liste des abréviations

A

ADN acide désoxyribonucléique
AFLP amplified fragment length polymorphism analysis
AMK amikacine
ARN acide ribonucléique
AUC aire sous la courbe

B

BET bromure d'éthidium
BLSE β -lactamase à spectre étendu
BMR bactérie multi-résistante

C

C1G céphalosporine de première génération
C2G céphalosporine de deuxième génération
C3G céphalosporine de troisième génération
C4G céphalosporine de quatrième génération
CA-SFM Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CAZ ceftazidime
CHDL carbapenems hydrolyzing class D β -lactamases
CHU Centre Hospitalier Universitaire
CIP ciprofloxacine
CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute
Cmax concentration maximale
CMI concentration minimale inhibitrice
CMT Complex Mutant TEM
CRO ceftriaxone
CTX-M BLSE de type Céfotaximase-Munich

D

DDS : décontamination digestive sélective
dNTP désoxyribonucléotide triphosphate

DO densité optique

E

EARSS European Antimicrobial Resistance Surveillance System

E-BLSE entérobactérie productrice de β -lactamase à spectre étendu

EDTA acide éthylène diamine tétra-acétique

EHPAD établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes

EPC entérobactérie productrice de carbapénémase

ERV entérocoque résistant à la vancomycine

ERT ertapénème

EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

F

FDA Food and Drug Administration

FEP céfépime

FOS fosfomycine

FOX céfoxitine

G

GEN gentamicine

GES Guyana extended-spectrum- β -lactamase

I

I intermédiaire

IBL inhibiteur de β -lactamase

IMI imipénémase

IMP imipénème

IN infection nosocomiale

Inc : groupe d'incompatibilité plasmidique

K

KPC *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

L

LPS lipopolysaccharide

M

MALDI-TOF Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight

MBL métallo- β -lactamase

MDR multiple drug resistant

MgCl₂ chlorure de magnésium

MH Mueller Hinton

MLST multilocus sequence typing

MVLA multiple-locus variable tandem repeat number analysis

N

NaCl chlorure de sodium

NDM New Delhi Metallo- β -lactamase

NIT nitrofurantoïne

O

OMS Organisation Mondiale de la Santé

ORI origine de réplication

OTU : unité taxonomique fonctionnelle

OXA oxacillinase

P

PAVM pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

PB paire de bases

PCR polymerase chain reaction

PFGE pulsed-field gel electrophoresis

Pk/Pd pharmacocinétique/pharmacodynamique

PLP protéine liant les pénicillines

PTZ pipéracilline-tazobactam

R

R résistant

Raisin Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des IN

Rpm rotation par minute

S

S sensible

SARM Staphylocoque aureus résistant à la méticilline

SDRA syndrome de détresse respiratoire

SDS sodium dodecyl sulfate

SHV sulphhydryl variable

SME Serratia marcescens enzyme

SXT triméthoprime-sulfaméthoxazole

T

TEM témocilline

TOB tobramycine

TRI TEM résistante aux inhibiteurs

TrisHCl Tris hydrochloride

V

VIM Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase

VPN valeur prédictive négative

VPP valeur prédictive positive

Valorisations Scientifiques

Articles scientifiques

Prevel R, Boyer A, M'Zali F, Lasheras A, Zahar JR, Rogues AM, Gruson D. Is systematic fecal carriage screening of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae still useful in intensive care unit: a systematic review. *Crit Care*. 2019.14;23(1):170. doi: 10.1186/s13054-019-2460-3

Boyer A, Goret J, Clouzeau B, Romen A, **Prevel R**, Lhomme E, et al. Tailoring Empirical Antimicrobial Therapy in Subjects With Ventilator-Associated Pneumonia With a 10-Hour E-Test Approach. *Respir Care*. 2019. 64(3):307-312. doi: 10.4187/respcare.06255.

Prevel R, Boyer A, M'Zali F, Cockenpot T, Lasheras A, Dubois V, Gruson D. Extended Spectrum Beta-Lactamase producing Enterobacteriaceae faecal carriage in a medical Intensive Care Unit: low rates of cross-transmission and infection. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Jul 10;8:112. doi: 10.1186/s13756-019-0572-9.

Prevel R, Berdaï D, Boyer A. Antibiotics for Ceftriaxone-Resistant Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections. *JAMA*. 2019. 321(6):613. doi: 10.1001/jama.2018.19349.

Communications orales en congrès

40ème congrès de la SRLF, Paris janvier 2018

Prevel R, Cockenpot T, M'Zali F, Andre C, Boyer A, Dubois V, Gruson D. Absence of ESBL-E fecal carriage cross-transmission in a medical ICU »

Communications affichées

**European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Espagne
Avril 2018**

Prevel R, Cockenpot T, Andre C, M'Zali F, Boyer A, Dubois V, Gruson D. Absence of ESBL-E fecal carriage cross-transmission in a medical ICU.

Bailleul G, Toret M, Payet A, **Prevel R**, Kann M, M'Zali F. Monitoring the loss of *Escherichia coli* CTX-M-1 ESBL under the selection pressure of various antimicrobial agents by mean of real-time quantitative PCR.

**European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienne, Autriche
Avril 2017**

Prevel R, Cockenpot T, Boyer A, Andre C, Gruson D, Dubois V. Community origin of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriales* (ESBL-E) fecal carriage in ICU and susceptibility to carbapenems alternatives.

Communications orales en colloque

1ère journée thématique des étudiants de l'Ecole Santé-Sciences de Bordeaux, mars 2019

« Human microbiota : a new organ to resuscitate ? »

Annual conference FR Transbiomed, University of Bordeaux, décembre 2018, « Gut microbiota: a new weapon to fight against antimicrobial resistance? »

Financement obtenu

Lauréat de l'Appel d'Offre Interne du CHU de Bordeaux 2019 ProbaTazo

Traitement de la pneumopathie acquise sous ventilation mécanique du patient colonisé à BLSE en réanimation : efficacité d'une stratégie utilisant la pipéracilline-tazobactam pour le traitement probabiliste

Introduction

1) Entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi

1.1. Entérobactéries

1.1.1 Taxonomie et phylogénie

La taxonomie des entérobactéries a été bouleversée par l'émergence de la biologie moléculaire ayant permis le séquençage du gène codant pour l'acide ribonucléique (ARN) ribosomique 16S. L'arbre phylogénétique des entérobactéries est désormais construit à partir de ces séquences et la classification traditionnelle en « tribus » fondée sur des caractères biochimiques est actuellement caduque (2). Ainsi, au sein du règne *Bacteria*, les entérobactéries appartiennent à l'embranchement *Proteobacteria*. Le terme protéobactéries est en référence au dieu grec Protée (dieu marin qui avait la capacité de se métamorphoser) pour souligner la grande variété de bactéries composant cet embranchement. Les protéobactéries sont divisées en 6 classes, de α à ζ . Les entérobactéries appartiennent à la classe des *Gamma Proteobacteria*, puis à l'ordre des *Enterobacteriales*. La famille des *Enterobacteriaceae* est une vaste famille qui représente près des trois quarts des souches isolées à partir de prélèvements cliniques humains (2). Cette vaste famille est composée d'environ 40 genres de bactéries pour plus de 130 espèces. Les espèces les plus communément isolées à partir des prélèvements cliniques appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia*.

1.1.2 Structure et caractères cultureux

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, le plus souvent courts (1 à 6 μ m), droits, immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche, aéro-anaérobie facultatifs, fermentaires, oxydase négative, catalase positive, nitrate réductase positive (à de rares exceptions près).

Elles poussent habituellement très aisément sur les milieux de culture standards, comme le milieu Muller Hinton (MH). La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37 °C, à l'exception de quelques genres tels *Yersinia*, *Pantoea* et *Erwinia*.

Les entérobactéries possèdent de très nombreux antigènes dont certains sont utilisés pour le diagnostic : antigènes O (antigène somatique de paroi constitué de la partie polysaccharidique

du lipopolysaccharide [LPS] thermostable à 100°C), antigènes H (antigène flagellaire thermolabile, composé de protéines appelées flagellines), antigènes d'enveloppe (K, Vi...).

1.1.3 Habitat et pathogénie

La plupart des entérobactéries sont des commensaux des tractus digestifs humains et animaux (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp.*) mais elles peuvent également être retrouvées préférentiellement dans l'environnement (germes saprophytes : *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.*).

L'ensemble des entérobactéries peut être subdivisé en deux groupes en fonction de leur pathogénicité: (i) d'une part les espèces entéro-pathogènes dont l'ingestion provoque quasi-systématiquement une infection se manifestant par des diarrhées avec ou sans signes d'accompagnement (*Salmonella sp.*, *Yersinia sp.*, *Shigella sp.*, certaines souches d'*E. coli*, *Salmonella typhi*) ; (ii) d'autre part les entérobactéries commensales ou saprophytes du microbiote intestinal (*E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Morganella sp.*, *Providencia sp.*, *Serratia sp.*, *Citrobacter sp.*) responsables d'infections extra-intestinales. Elles sont d'ailleurs les bactéries les plus fréquemment impliquées en pathologie infectieuse humaine, à la fois dans les infections communautaires et nosocomiales (3). Cela s'explique par leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur vitesse de multiplication, et leur capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. Un petit nombre d'espèces (dont *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, et *Serratia marcescens*) est responsable de la majorité des infections car ces espèces regroupent toutes ces caractéristiques (4). Il s'agit principalement d'infections urinaires, pulmonaires (principalement les pneumopathies associées aux soins ou nosocomiales), intraabdominales dont les péritonites, de bactériémies et de méningites (5).

1.1.4 *Escherichia coli*

E. coli est l'espèce la plus fréquemment isolée à partir des prélèvements cliniques et est, de loin, le pathogène le plus important pour les humains (3). C'est un commensal de l'appareil digestif humain et animal à sang chaud qui représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin, à raison de 10^6 à 10^9 bactéries par gramme de selles (flore totale : 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme) (6).

E. coli est également retrouvé dans l'eau et les boues, augmentant ses capacités de dissémination (7). Plus de 20 000 gènes différents ont été amplifiés au sein de l'espèce *E. coli* et une souche d'*E. coli* peut contenir 4200 à 5500 gènes au sein de son génome (8). Les souches appartenant à l'espèce *E. coli* sont répartis en huit groupes phylogénétiques : A, B1, B2, C, D, E, F (9). Les quatre groupes principaux sont A, B1, B2, et D. En raison de divers facteurs de virulence et de différents mécanismes pathogéniques, les infections à *E. coli* sont de gravité très variable. Elles sont de deux types : (i) infections du tractus digestif entraînant des diarrhées, (ii) et infections extra-intestinales (10). Les souches dites « uropathogènes » parviennent à coloniser l'arbre urinaire grâce à la présence de pili ou fimbriae (adhésines) à leur surface qui permettent la fixation des bactéries à des récepteurs exprimés à la surface de cellules épithéliales urinaires. L'utilisation de matériel (cathéter, sonde urinaire, sonde d'intubation oro-trachéale, ...) favorise la survenue d'infections nosocomiales (IN) à *E. coli* car cette bactérie est capable de former un biofilm à la surface de ces matériels. Ces IN causées par *E. coli* représentent environ 26 % des IN au sein des établissements de santé français et 9,1 % des IN en réanimation (11). *E. coli* est également responsable d'infections pulmonaires, de méningites et d'infections intra-abdominales (cholécystites, angiocholites, péritonites, salpingites, infections postopératoires). Toutes ces infections peuvent se compliquer de bactériémies.

1.1.5 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est principalement isolée en milieu hospitalier et représente environ 5 % des IN au sein des établissements de santé français (RAISIN) et 5,7 % des IN en réanimation (Réa Raisin) (11). Elle est responsable principalement d'infections urinaires et respiratoires, parfois compliquées de bactériémies. Comme *E. coli*, *K. pneumoniae* a la capacité d'adhérer et de se multiplier sur les surfaces inertes, de produire du biofilm et donc de coloniser du matériel biomédical (12). Le portage de *K. pneumoniae* survient le plus souvent après une longue période d'hospitalisation chez des patients fragilisés (immunodépression, matériel médical invasif, comorbidités, ...) ayant reçu des antibiothérapies.

1.1.6 *Enterobacter spp.*

Le genre *Enterobacter* regroupe 22 espèces, principalement environnementales mais également commensales du tube digestif de certains mammifères dont l'Homme. Ces bactéries peuvent être pathogènes opportunistes pour l'Homme, en particulier *E. cloacae* et *E. aerogenes*. Ces bactéries combinent souvent plusieurs mécanismes de résistance (bêta-lactamases dont certaines à spectre élargi, modifications du lipopolysaccharide, porines ou pompes d'efflux) ce qui le rend assez fréquemment multi-résistantes (13). Le fait d'être des germes opportunistes et d'avoir une adaptation rapide à une pression antibiotique explique pourquoi ces bactéries sont fréquemment retrouvées chez des patients immunodéprimés ou en réanimation et sont parfois responsables d'épidémies intra-hospitalières (14). Les bactéries du genre *Enterobacter* sont ainsi responsables d'environ 5% des bactériémies et des pneumopathies nosocomiales, 10% des péritonites post-chirurgicales et 4% des infections urinaires (15).

Ces 3 espèces sont celles appartenant au groupe ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*) étant fréquemment porteuses de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) (16).

1.2. Résistance aux β -lactamines

1.2.1 Les β -lactamines

Les β -lactamines sont largement utilisées en médecine humaine, notamment dans le traitement des infections à entérobactéries, en raison de leur activité sur les bactéries fréquemment rencontrées en médecine humaine, de leur activité bactéricide et de leur faible toxicité. Elles inhibent la synthèse de la paroi bactérienne lors de la répllication par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP) impliquées dans la synthèse du peptidoglycane grâce à leur chaîne latérale acyl D-Ala-D-Ala. Leur structure moléculaire de base et commune aux molécules de la famille est le noyau β -lactame indispensable à l'activité antibiotique. Les molécules sont réparties en groupes selon la nature des cycles et/ou des radicaux. On retrouve les pénicillines (pénicillines G, M, A, carboxypénicillines, uréïdopénicillines) et les céphalosporines (C1G, C2G, C3G, C4G et C5G), les inhibiteurs de β -lactamase (IBL) (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam et

relebactam), les monobactames (β -lactamines monocycliques), et les carbapénèmes (Annexe 1 page 161).

Les céphalosporines sont les molécules ayant le plus évolué et sont, de ce fait, classées en générations successives, classement globalement superposable à leur développement au cours du temps. Cette répartition en différents groupes reflète surtout un élargissement progressif du spectre d'action sur les bactéries à Gram négatif. Les C3G sont ainsi actives sur des souches produisant des pénicillinases de haut niveau qui hydrolysent les C1G et C2G (à l'exception des céphamycines). Les C4G sont actives sur certaines souches productrices de céphalosporinase de haut niveau. Les C4G sont parfois associées à des IBL (ceftazidime-avibactam et ceftolozane-tazobactam) restaurant une activité de ces antibiotiques contre les E-BLSE. Enfin la ceftaroline, présentée comme une C5G, présente un intérêt pour les souches de staphylocoque résistant à la méthicilline (SARM) sur lesquelles elle demeure active malgré la présence de PLP2A anormales (17).

1.2.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes

Le caractère sensible ou résistant d'une souche bactérienne à un antibiotique ne peut pas se mesurer directement mais doit être extrapolé à partir de l'activité antibactérienne constatée *in vitro*. La catégorisation clinique (classement des souches bactériennes en sensibles « S », intermédiaires « I » et résistantes « R ») vis-à-vis d'un antibiotique donné guide la possibilité ou non d'utiliser cet antibiotique dans le traitement de l'épisode infectieux causé par la bactérie. Cette catégorisation clinique est basée sur des valeurs critiques de concentrations minimales inhibitrices (CMI), méthode de référence, ou de diamètres de zones d'inhibition (18). Les valeurs critiques sont proposées par des comités nationaux tels que le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en France, l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) en Europe ou le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) aux Etats-Unis. Les concentrations critiques sont établies à partir de trois types de critères : bactériologiques, pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (Pk/Pd) et cliniques (18).

Les critères bactériologiques reposent sur la détermination d'une CMI spécifique pour chaque couple souche bactérienne-antibiotique donné. La CMI est définie comme la concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber toute culture visible d'une souche bactérienne (bactériostase), après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C.

Les critères Pk/Pd reposent sur la relation entre la CMI déterminée *in vitro* et la concentration possible de l'antibiotique au site de l'infection. Une souche est dite « sensible » à un antibiotique si la CMI est inférieure aux concentrations sanguines, tissulaires ou présentes dans les principaux foyers pathologiques avec une antibiothérapie à doses usuelles restant dans les limites de l'index thérapeutique. Une souche est dite « résistante » si la CMI dépasse les concentrations les plus élevées qu'il est possible d'obtenir *in vivo* sans sortir de l'index thérapeutique. Elle est dite « intermédiaire » si sa CMI est supérieure aux concentrations sanguines mais inférieures aux concentrations obtenues dans certains tissus potentiellement infectés comme les voies urinaires ou biliaires. La détermination des valeurs critiques repose sur les données d'absorption (pour les antibiotiques administrés par voie orale), de distribution, de biotransformation et d'élimination. Des indices Pk/Pd ont ainsi été développés. Le rapport concentration maximale (C_{max}) / CMI appelé quotient inhibiteur, et le rapport aire sous la courbe (AUC) / CMI sont les deux indices prédictifs de l'efficacité des antibiotiques à bactéricidie concentration-dépendante comme les aminosides. Le temps pendant lequel la concentration d'antibiotique est au-dessus de la CMI du germe est l'indice prédictif de l'efficacité des antibiotiques à bactéricidie temps-dépendante comme les β-lactamines (18).

Enfin, les critères cliniques sont issus d'études appliquant les CMI en situation de traitement réel, idéalement dans le cadre d'essai contrôlé randomisé en double aveugle. Le critère de jugement le plus pertinent dans un contexte de réanimation est la mortalité soit en réanimation soit à trente jours. Ils valident les critères précédents en vérifiant le succès (survie) ou l'échec thérapeutique (décès) en fonction des concentrations critiques proposées. De nombreuses études ont ainsi démontré que dans les infections sévères à entérobactéries nécessitant une hospitalisation en réanimation, les concentrations sériques des antibiotiques temps-dépendant doivent être 4 à 5 fois supérieures à la CMI de la souche bactérienne en cause et maintenues à ce niveau plus de 50 % du temps (19). Les recommandations communes françaises et européennes CA-SFM/EUCAST 2019 présentent les CMI des principales entérobactéries pour les antibiotiques couramment utilisés.

https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM2019_V1.0.pdf

1.2.3 Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques, contrairement aux antiseptiques, agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises. Les bactéries sont capables de développer des résistances aux antibiotiques, par différents mécanismes – hérités de la compétition naturelle entre microorganismes – dont la nature et l'efficacité varient suivant les espèces et les molécules.

Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques sont : l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification de la cible bactérienne de l'antibiotique, la diminution de l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie par diminution de la perméabilité membranaire et l'efflux actif de l'antibiotique hors de la bactérie. Ces mécanismes peuvent être associés (Figure 1).

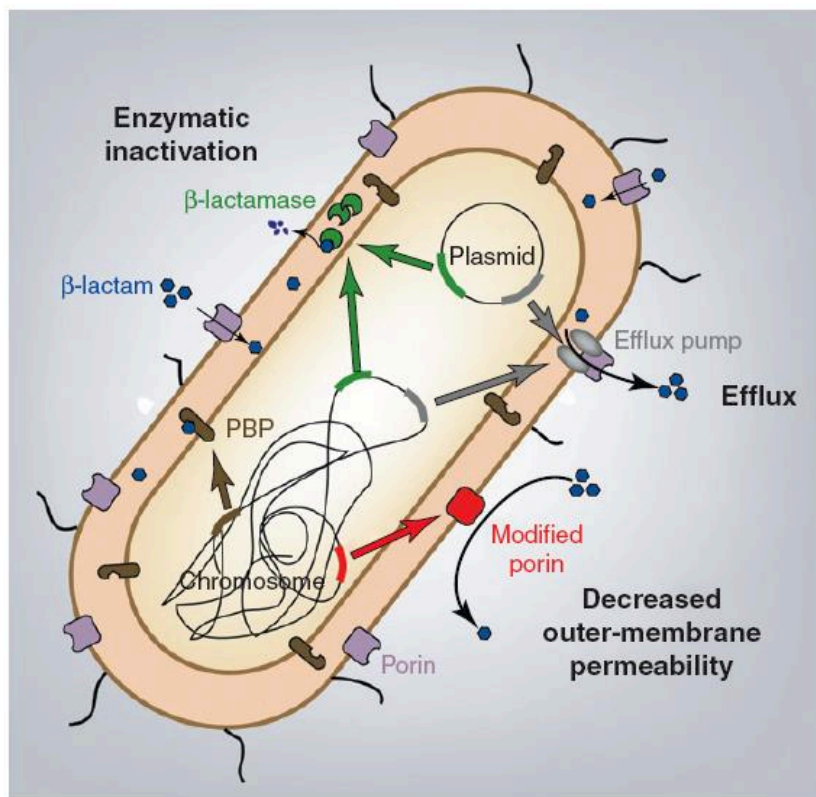


Figure 1. Principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries (Nordmann *et al.*, 2012).

1.2.4 Distinction entre résistance naturelle et résistance acquise

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle ou intrinsèque préexiste à l'introduction des antibiotiques produits par l'Homme et est caractéristique d'une espèce bactérienne. En effet, de nombreuses molécules aux propriétés antibactériennes sont synthétisées naturellement par différentes espèces bactériennes dans le cadre de la compétition inter-espèces. Les bactéries cibles ont donc à leur tour produit des

molécules pour devenir résistantes aux antibactériens. Le support génétique de cette résistance est chromosomique et, de ce fait, toujours transmissible à la descendance (transmission verticale).

La résistance acquise apparaît, elle, chez certaines souches au sein d'une espèce normalement sensible à un antibiotique donné. Cette résistance est le résultat de modifications génétiques secondaires à des mutations ponctuelles de gènes endogènes ou à l'acquisition de gènes exogènes *via* des éléments génétiques mobiles comme les plasmides et les transposons. La transmission peut donc être verticale et/ou horizontale. Les mutations peuvent également modifier un gène de résistance acquis au préalable, élargissant ainsi le spectre de la résistance. La résistance acquise par mutation aboutit, sous réserve de la viabilité des mutants et du coût énergétique engendré par les mutations, à l'émergence d'un clone résistant au sein de l'espèce bactérienne principalement par transmission verticale. Cette résistance représente environ 20% des résistances observées en clinique humaine. En plus de cette résistance acquise par mutation, l'acquisition de gènes de résistance exogènes, *via* des éléments génétiques mobiles, est plus fréquente et représente ainsi 80% des résistances acquises décrites en clinique humaines.

1.2.5 Résistance naturelle aux β -lactamines

Les entérobactéries sont toutes naturellement résistantes à la pénicilline G et aux pénicillines M, et la plupart d'entre elles produisent en plus naturellement diverses β -lactamases, ce qui a permis de les classer en sept groupes phénotypiques de résistance naturelle (Tableau 1) (18).

	Péni A	IBL	Carboxy	C1G	C2G	C3G
Groupe 0 <i>Salmonella spp</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S	S	S
Groupe 1 <i>E. coli</i> , <i>Shigella spp.</i> Case chromosomique réprimée	S	S	S	S	S	S
Groupe 2 <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Citrobacter koseri</i> Pénicillinase bas niveau	I/R	S	I/R	S	S	S
Groupe 3 <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Hafnia alvei</i> Case bas niveau inductible	R	R	S	R	S/R*	S
Groupe 4 <i>Yersinia spp.</i> Céphalosporinase et pénicillinase	R	R	I/R	R	R	S
Groupe 5 <i>Proteus vulgaris</i> et <i>Proteus penneri</i> Cefuroximase	R	S	I/R	R	R sauf fox	S
Groupe 6 <i>Kluyvera ascorbata</i> , <i>Kluyvera cryocrescens</i> , <i>Kluyvera georginia</i> , <i>Rahnella aquatilis</i> , <i>Citrobacter sedlakii</i> et <i>Erwinia persicina</i> BLSE	R	R	S	R	R	S

Tableau 1. Répartition des entérobactéries en fonction de leur profil de résistance naturelle.
Péni A : pénicilline du groupe A. IBL : association avec inhibiteur de bêta-lactamases.
Carboxy : carboxypénicilline. C1G : céphalosporine de 1ère génération. C2G : céphalosporine de 2ème génération. C3G : céphalosporine de 3^{ème} génération. Case : céphalosporinase. Fox : céfoxitine* Le comportement vis-à-vis des C2G et des céphamycines permet de répartir les espèces en 3 sous-groupes : (i) les espèces sensibles au céfuroxime (C2G) et à la céfoxitine (céphamycine) : *H. alvei*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, et *P. agglomerans* ; (ii) les espèces plus résistantes à la céfoxitine qu'au céfuroxime : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, et *C. freundii* ; (iii) enfin les espèces plus résistantes au céfuroxime qu'à la céfoxitine : *S. marcescens*, *M. morganii*.

A la résistance naturelle des entérobactéries aux β -lactamines peuvent s'ajouter un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise vis-à-vis de cette famille d'antibiotique. La résistance par acquisition ou hyperproduction de β -lactamases est le mécanisme le plus fréquemment rencontré chez les bactéries à Gram négatif et notamment les entérobactéries.

Tous les mécanismes et les phénotypes de résistance acquise rencontrés chez les entérobactéries ne seront pas traités ici, mais exclusivement les mécanismes donnant des phénotypes de résistance aux C3G, et notamment les BLSE.

1.2.6 Résistance acquise aux β -lactamines : les β -lactamases

Parmi les gènes de résistance aux antibiotiques, certains codent pour des enzymes, appelées β -lactamases, hydrolysant le cycle β -lactame des β -lactamines. Cette réaction d'hydrolyse provoque l'ouverture du cycle au niveau de la liaison amide grâce à la présence au site actif d'un résidu sérine ou d'un ou plusieurs ions métalliques Zn^{2+} . Selon le type d'antibiotique hydrolysé, les β -lactamases portent le nom de pénicillinase, céphalosporinase, BLSE ou carbapénémase.

La diversité des β -lactamases a conduit à de nombreuses tentatives de classification. Deux classifications sont classiquement retenues : la classification structurale de R.P. Ambler (20) basée sur des critères moléculaires et la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros (21) reposant sur des caractéristiques phénotypiques.

La classification d'Ambler définit 4 grandes classes, de A à D. Elle est basée sur l'homologie en acides aminés des séquences codant pour le site actif des β -lactamases. Les protéines de classe A, C et D sont les enzymes à sérine active et les enzymes de classe B correspondent aux métallo-enzymes à zinc. C'est la classification la plus simple et la plus utilisée en pratique courante médicale.

La classification de Bush repose sur l'activité hydrolytique des β -lactamases et sur leur sensibilité aux IBL. Cette classification offre la possibilité de relier les enzymes à leur rôle clinique permettant ainsi au biologiste de relier les propriétés d'une β -lactamase avec le profil de résistance microbienne observée pour une souche bactérienne (21).

Les différents types de β -lactamases principalement amplifiées à partir d'entérobactéries sont résumées Figure 2.

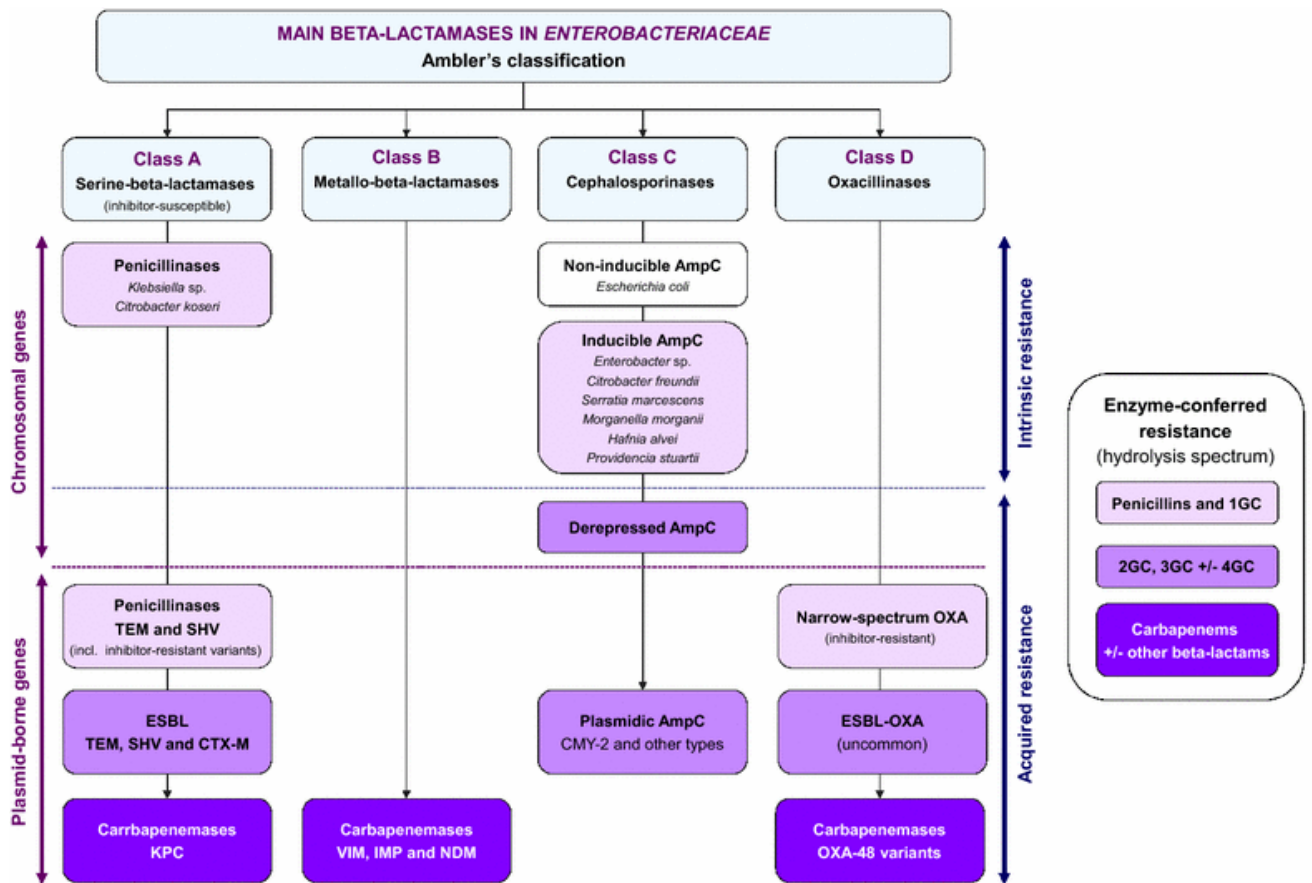


Figure 2. Principales bêta-lactamases retrouvées chez les Entérobactéries réparties selon la classification d'Ambler (Ruppé *et al.* 2015 (22))

1.2.7 Résistance acquise des entérobactéries aux β -lactamines : place des β -lactamases à spectre élargi

Il n'existe pas de définition consensuelle précise des BLSE (23). Le phénotype BLSE comprend une résistance de la bactérie aux pénicillines et aux céphalosporines, mais pas aux céphamycines ni aux carbapénèmes. La résistance aux C3G, aux C4G et à l'aztréonam est plus ou moins marquée selon les enzymes et les souches (18). Par ailleurs, l'activité hydrolytique des BLSE est inhibée par les IBL comme l'acide clavulanique ou le tazobactam (21). L'activité des associations β -lactamines - IBL (BL-IBL) est cependant variable car dépendante du type enzymatique et de son niveau de production. Elle reste généralement suffisante pour être la base de la détection phénotypique sur antibiogramme en milieu gélosé, par la mise en évidence d'une image de synergie entre les IBL et les C3G et/ou les C4G et/ou l'aztréonam décrivant la fameuse image en « bouchon de champagne » caractéristique des BLSE (voir figure 11 dans la partie « Matériels et Méthodes »). Cette synergie n'est toutefois pas forcément assez importante pour faire reposer le traitement antibiotique sur ces molécules.

A l'exception des enzymes de type OXA qui appartiennent à la classe D (BLSE de classe D), les BLSE font partie de la classe A au sein de la classification structurale d'Ambler. Cependant, la classe A étant un ensemble hétérogène, les BLSE ont une homologie moléculaire variable allant de 20 à 99 % (24).

Les entérobactéries classiquement retrouvées en pathologie humaine ont acquis des enzymes de type BLSE au moyen de 2 mécanismes : (i) par sélection de mutants des pénicillinases de type TEM et SHV ayant des mutations ponctuelles élargissant leur spécificité de substrat aux C3G et à l'aztréonam ; ces enzymes étant ensuite portées par des plasmides se disséminant au sein des entérobactéries depuis les années 1970 (25) ; (ii) par capture de nouveaux gènes codant pour des β -lactamases à spectre élargi en provenance du métagénome environnemental (typiquement venant des *Kluyvera spp.*). Appartenant à ce deuxième groupe, les enzymes de type CTX-M sont devenues le type de BLSE le plus répandu dans le monde entier (26).

1.2.7.1 BLSE de type TEM et SHV

Les enzymes TEM-1, TEM-2 et SHV-1 sont des pénicillinases à spectre étroit hydrolysant les pénicillines et les C1G, plus ou moins les C2G, et sensibles à l'acide clavulanique (27).

La première β -lactamase d'acquisition plasmidique chez une entérobactérie a été décrite en 1965, en Grèce. Elle provenait d'une souche d'*E. coli* isolée à partir d'une hémoculture d'un patient nommé Temoniera (28) et fut ainsi appelée TEM-1 (29). Son support génétique mobile par des plasmides et des transposons a facilité la diffusion de TEM-1 à de nombreuses autres espèces bactériennes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, et *Nisseria gonorrhoeae* (30). En quelques années, TEM-1 s'est répandue à travers le monde puis TEM-2 a été découverte. TEM-2 est une enzyme moins fréquente, ayant le même profil hydrolytique que TEM-1, mais différant par son promoteur et son point isoélectrique.

SHV-1 (pour sulphydryl variable) est une autre β -lactamase retrouvée chez *E. coli* et *K. pneumoniae* (31). Le gène codant SHV-1 a un support chromosomique chez la majorité des souches de *K. pneumoniae* mais est habituellement porté par un plasmide chez *E. coli*.

Au cours des années, la pression de sélection engendrée par l'utilisation massive de nouvelles β -lactamines, en particulier les C3G, a sélectionné de nouveaux variants de β -lactamases de type BLSE (30).

Les BLSE ont émergé durant les années 1980-90, juste après l'introduction en médecine humaine des C3G (23), et ont connu une expansion écologique importante, en particulier dans les services de réanimation où l'utilisation de ces molécules est très répandue. Ces BLSE étaient généralement codées par des gènes ayant un support plasmidique facilitant leur diffusion. Elles ont surtout été observées chez des souches de *K. pneumoniae* et *Enterobacter spp.*, responsables d'épidémies d'infections nosocomiales. Ainsi, la première BLSE de classe A nommée SHV-2 a été décrite en Allemagne en 1983 chez *K. ozaenae* (32). Elle dérivait de la pénicillinase SHV-1 par la simple variation d'un acide aminé (glycine en sérine à la position 238) (33), ayant pour conséquence de modifier l'activité enzymatique en élargissant le spectre d'hydrolyse aux C3G et l'aztréonam. En 1984, une souche de *K. pneumoniae* productrice d'une BLSE dérivée de la pénicillinase TEM-2, a été caractérisée en France. L'enzyme avait d'abord été nommée CTX-1 en raison de sa forte activité hydrolytique vis-à-vis du céfotaxime, puis le nom retenu fut finalement TEM-3, l'enzyme différant de TEM-2 par seulement deux substitutions d'acides aminés.

Les TEM et SHV BLSE ont été classées, au fur et à mesure de leur apparition, en deux grands groupes : les ceftazidimases qui confèrent un plus haut niveau de résistance au ceftazidime qu'au céfotaxime (Ex : TEM-5, TEM-24, SHV-4, SHV-5) et les céfotaximases qui confèrent un niveau de résistance équivalent à ces deux molécules (Ex : TEM-3, SHV-2) (18). Les BLSE de type TEM et SHV sont présentes dans le monde entier et sont actuellement représentées par au moins 136 membres (www.lahey.org/Studies/). La plupart sont des ceftazidimases, et seules quelques-unes sont des céfotaximases (24).

1.2.7.2 β -lactamases à spectre élargi de type OXA

Les enzymes OXA constituent une autre famille de β -lactamases. La plupart des β -lactamases de type OXA ne sont pas considérées comme BLSE car elles n'hydrolysent pas les C3G à un degré significatif, elles sont dites à « spectre étroit ». Cependant, certaines OXA BLSE possèdent un spectre étendu aux C2G, C3G et C4G. Alors que la plupart des BLSE de classe A sont retrouvées chez les entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*, etc.), les BLSE de type OXA sont principalement retrouvées chez *P. aeruginosa*, chez qui elles ont été découvertes pour la première fois dans un hôpital d'Ankara en Turquie (34) ainsi que chez *Acinetobacter baumannii* (35). Il en existe deux principaux types : (i) certaines BLSE sont simplement dérivées d'oxacillinase à spectre étroit par mutation ponctuelle. Un grand nombre d'oxacillinases BLSE

ont été identifiées parmi les variants d'OXA-10 (OXA-11, 14, 16 et 17, 35, 142, 145, 147), d'OXA-2 (OXA-15, 32, 34, 36, 53, 141) ou d'OXA-13 (OXA-19, 28). Cette évolution à partir d'enzymes mères à spectre plus étroit vers des BLSE a de nombreux parallèles avec l'évolution des BLSE de type TEM et SHV (23) ; (ii) d'autres peuvent être des enzymes complètement différentes avec une homologie de séquence d'acides aminés faible comme OXA-18, et 45 (36). Toutes confèrent une résistance franche au céfotaxime, parfois à la ceftazidime et à l'aztréonam.

Plus récemment, de nouvelles BLSE codées par des plasmides et non dérivées des pénicillinases TEM, SHV, et OXA ont émergé. Il s'agit des céfotaximases de type CTX-M, et des ceftazidimases de type PER, BES, GES (ou IBC) et VEB (30). Les enzymes de type PER sont surtout observées en Turquie (PER-1) et en Amérique du Sud (PER-2), VEB-1 en Asie, et les enzymes de type GES en Europe et Amérique du Sud. A l'exception des CTX-M qui seront traitées ci-dessous, ces BLSE ne seront pas abordées dans ce travail.

1.2.7.3 β -lactamases à spectre élargi de type CTX-M

L'épidémiologie des BLSE a été bouleversée par l'émergence des enzymes de type CTX-M qui ont disséminé dans toutes les entérobactéries. *E. coli* et *K. pneumoniae* sont les espèces les plus couramment productrices de CTX-M, mais ces enzymes ont aussi été détectées chez de nombreuses autres espèces, dont *S. enterica*, *Shigella sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter sp.*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *M. morganii* et *Providencia sp.* (37).

La première observation date de 1986, année pendant laquelle une BLSE non-TEM, non-SHV, désignée FEC-1, a été découverte au Japon chez une souche d'*E. coli* résistante au céfotaxime, isolée de la flore fécale d'un chien de laboratoire utilisé pour des études à visée pharmacocinétique sur les β -lactamines (38). En 1989, une équipe allemande a rapporté une souche clinique d'*E. coli* résistante au céfotaxime, isolée à partir de l'exsudat de l'oreille d'un nouveau-né. Cette souche produisait une BLSE non-TEM et non-SHV, désigné CTX-M-1, en référence à son activité hydrolytique vis-à-vis du céfotaxime (39). Dans le même temps, la diffusion de souches de salmonelles résistantes au céfotaxime débutait en Amérique du Sud (40). Les β -lactamases observées dans ces différentes régions avaient toutes des valeurs de point isoélectrique alcalines, elles possédaient une activité hydrolytique supérieure pour le céfotaxime et conféraient donc un niveau de résistance plus élevé au céfotaxime qu'à la ceftazidime, avec une sensibilité aux IBL. En 1992, le même type de BLSE a été rapporté dans

une souche clinique d'*E. coli*, isolée au début de l'année 1989 en France chez un patient ressortissant italien (41). Le séquençage de cette enzyme désignée MEN-1 montrait seulement 39% d'identité avec les enzymes TEM et SHV. Quelques années plus tard, une enzyme liée à MEN-1 (83% d'homologie) a été rapportée au Japon. Elle était produite par une souche d'*E. coli* résistante au céfotaxime et fut nommée Toho-1 (42). Plus tard, en 1996, le séquençage a permis de révéler que CTX-M-1 était identique à MEN-1, et qu'il s'agissait d'une variante de Toho-1. Cette dernière a alors été désignée CTX-M-2 et a été de nouveau identifiée dans une souche de *Salmonella sp.* résistante au céfotaxime isolée en Argentine en 1990 (43). La même année, une variante de CTX-M-1 désignée CTX-M-3, a été identifiée chez différentes espèces d'entérobactéries (44).

La famille des CTX-M est assez hétérogène et comprend au moins six sous-lignages ou groupes (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et KLUC, du nom des enzymes archétypales de chaque groupe) (Figure 3). L'enzyme CTX-M-15 est la BLSE la plus fréquemment isolée dans les souches E-BLSE au niveau mondial (26,45,46).

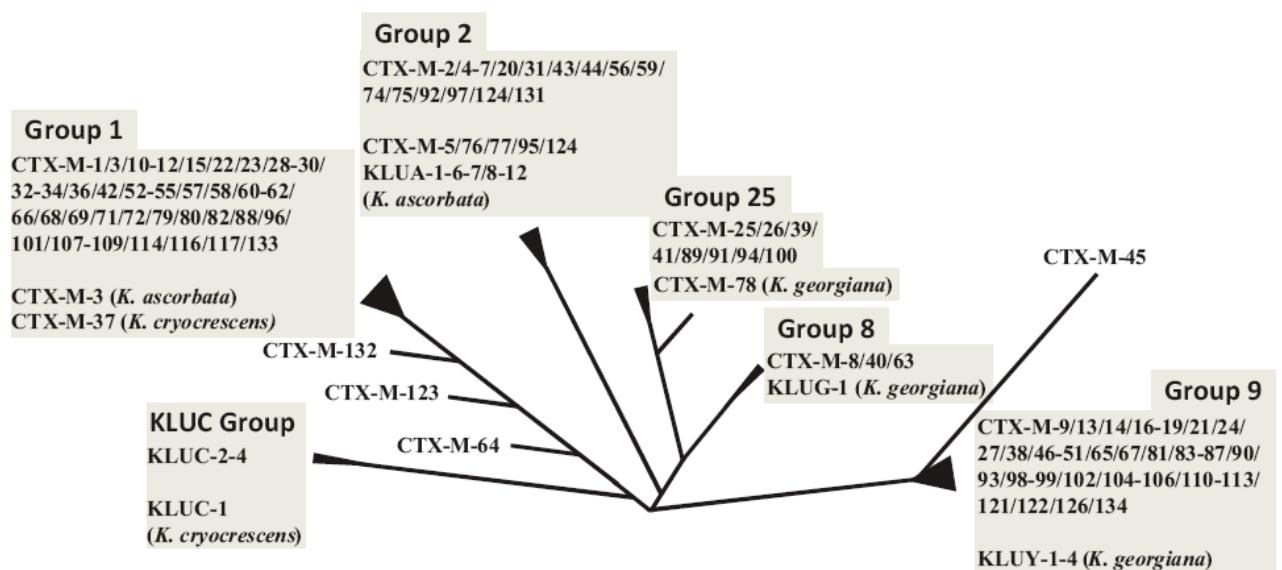


Figure 3. Arbre phylogénétique présentant les distances entre les différents groupes CTX-M (D'Andrea *et al.*, 2013).

Chacun des groupes diffère des autres par au moins 10% des résidus d'acides aminés (26). Chaque groupe comprend à son tour un certain nombre de variants alléliques mineurs qui diffèrent les uns des autres par une ou plusieurs substitutions d'acides aminés ($\leq 5\%$ de différence en résidus d'acides aminés). De plus, il y a au moins quatre variants CTX-M qui

présentent une structure hybride. Il s'agit de CTX-M-45 (anciennement Toho-2) qui est un hybride de CTX-M-14 avec une protéine d'origine inconnue, et CTX-M-64, CTX-M-123 et CTX-M-132 qui sont des hybrides de CTX-M-15 avec différents segments de CTX-M14. Les groupes CTX-M-1 et 9 regroupent la majorité des enzymes CTX-M. Cela suggère possiblement une plus grande plasticité des gènes contenus dans ces groupes ou bien reflète simplement un nombre plus élevé de progéniteurs initiaux ce qui augmente la probabilité d'évoluer en variants différents (47).

L'origine des gènes *bla_{CTX-M}* codant pour les enzymes CTX-M a finalement été élucidée. Comme pour la quasi-totalité des gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes codant pour les CTX-M dérivent de l'évolution et de la dissémination de gènes permettant initialement aux bactéries de s'adapter à leur environnement. Il s'agit ici très probablement d'une mobilisation de gènes chromosomiques présents à l'état naturel chez certaines entérobactéries environnementales du genre *Kluyvera spp.* (*K. ascorbata*, *K. gorgiana* et *K. cryocrescens*) par transfert médié par un élément génétique mobile. En effet, les gènes acquis sont généralement portés par des plasmides conjugatifs et sont rarement intégrés au chromosome (sauf chez *P. mirabilis*) (48–50). Dans la plupart des cas, les gènes *bla_{CTX-M}* sont associés à ISEcp1 ou ISCR1, deux séquences d'insertion différentes capables de mobiliser des fragments d'ADN voisins (51). Ces séquences d'insertion semblent impliquées dans la capture des gènes *bla_{CTX-M}* à partir du chromosome de *Kluyvera sp.* et dans leur transposition sur des plasmides, comme cela a été démontré pour ISEcp1 dans un modèle expérimental (52). Les gènes *bla_{CTX-M}* acquis sont généralement flanqués de régions supplémentaires dérivées du chromosome de *Kluyvera sp.* dont les tailles peuvent varier caractérisant ainsi différents événements de mobilisation (47). Cela suggère que chaque groupe CTX-M est probablement dérivé d'une ou plusieurs souches différentes de *Kluyvera*, et l'existence de plusieurs groupes de gènes transférables *bla_{CTX-M}* est compatible avec une histoire de multiples événements de capture de gènes (26). Les mécanismes de dissémination plasmidique des E-BLSE sont détaillées plus précisément dans le paragraphe 1.3.2

D'autre part, le transfert de gènes plasmidiques codant pour des enzymes CTX-M dans des souches clonales d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*, a généré un certain nombre de clones virulents et multirésistants dits à « haut risque » (53), ce qui a également contribué à la diffusion rapide et globale des BLSE de type CTX-M. Les différents aspects de cette dissémination clonale sont développés plus précisément dans le paragraphe 1.3.1.

Grâce à cette dissémination plasmidique et clonale, les BLSE de type CTX-M sont devenues les plus fréquentes à travers le monde en quelques années (54). En particulier, leur dissémination ne s'est pas limitée au milieu hospitalier, comme cela avait été décrit jusque-là pour les autres BLSE, mais elles se sont également répandues dans la communauté (47).

Enfin, bien que les enzymes de type CTX-M soient principalement rapportées chez des entérobactéries, il faut néanmoins noter qu'elles ont parfois été signalées chez d'autres espèces bactériennes, comme *P. aeruginosa* (55,56), *Acinetobacter spp.* (57,58), *Vibrio cholerae* (59), *Aeromonas sp.* (60) ou *Stenotrophomonas maltophilia* (61). Cela souligne la possibilité d'une transmission des gènes *bla_{CTX-M}* à des espèces n'appartenant pas aux entérobactéries. Cependant, la plupart des cas rapportés étaient sporadiques, sans aucune tendance significative à la transmission croisée et à la diffusion, ce qui suggère que les plasmides diffusent moins ou sont moins bien adaptés à ces espèces qui sont donc peu propices à la dissémination des gènes *bla_{CTX-M}* (26). Les BLSE, bien que très largement répandues, ne sont pas la seule source de résistance acquise aux β -lactamines et cohabitent avec d'autres mécanismes.

1.2.8 Associations de mécanisme de résistance

L'hyperproduction d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique associée à une imperméabilité est la cause la plus fréquente de résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries (18). La membrane externe des entérobactéries contient des protéines spécifiques, appelées porines, qui forment des canaux hydrophiles permettant l'absorption sélective de substances nutritives essentielles et d'autres composés, y compris les antibiotiques. Toute modification du nombre ou de l'activité des porines bactériennes peut avoir un effet sur la résistance aux antibiotiques par un mécanisme d'imperméabilité (62). Ce phénotype de résistance aux carbapénèmes a été observé au départ chez des entérobactéries, en particulier chez *Enterobacter spp.*, qui associent des modifications des porines OmpC et OmpF en plus de l'hyperproduction de leur céphalosporinase chromosomique AmpC (63). Des mécanismes similaires ont été rapportés chez d'autres entérobactéries hyperproduisant une enzyme AmpC plasmidique de type CMY-2, DHA-1, ou ACC-1 par exemple, conjointement avec des modifications des porines OmpK35/36 pour *K. pneumoniae*, OmpF et OmpC pour *E. coli* ou OmpF pour *Salmonella typhimurium* (64–66).

De la même façon, une imperméabilité membranaire associée à la production d'une BLSE de type TEM, SHV ou CTX-M peut aussi conférer une résistance aux carbapénèmes. Ce

mécanisme a été signalé chez presque toutes les espèces d'entérobactéries, dont *E. coli* et *K. pneumoniae* (67,68). Néanmoins, plusieurs études suggèrent que la résistance aux carbapénèmes par anomalies des porines est instable chez les entérobactéries (62), que les souches résistantes aux carbapénèmes sans production de carbapénémase sont généralement moins résistantes aux antibiotiques d'autres familles et que leur résistance n'est pas transférable horizontalement. Pour ces raisons, elles sont considérées comme moins préoccupantes que les souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase (3).

1.3. Dissémination des E-BLSE

Comme décrit précédemment, les gènes codant pour les E-BLSE ont pu être transférés des *Kuyvera spp.* aux autres entérobactéries grâce à la mobilisations d'éléments génétiques sur des plasmides.

1.3.1 Dissémination plasmidique

Les plasmides sont des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) double brin extra-chromosomique de structure en général circulaire et de taille variable (de 1 kb à plus de 200 kb), capables de répllication autonome. Ils peuvent porter des gènes codant pour des facteurs de virulence mais aussi être vecteurs de transmission horizontale de résistance aux antibiotiques dont les bêta-lactamines, les aminosides, les macrolides, les quinolones et le triméthoprim (50). Des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques peuvent d'ailleurs être médiées par un même plasmide comme c'est fréquemment le cas pour les plasmides portant un gène BLSE. Les plasmides peuvent être échangés entre bactéries soit par conjugaison autonome soit par mobilisation grâce à un autre plasmide et sont donc des pourvoyeurs majeurs d'échange de matériel génétique entre bactéries. La transmission horizontale médiée par les plasmides peut s'opérer intra-espèce ou entre bactéries d'espèce, de genre voire de phyla différents en fonction du spectre d'hôte du plasmide et de son caractère conjugatif ou non.

Plus de 580 séquences ADN de plasmides présents dans des entérobactéries d'intérêt clinique ont été décrits et référencés sur les bases de données, 242 isolés à partir d'*E. coli*, et 62 à partir de *K. pneumoniae* (69). Les plasmides acquièrent des éléments génétiques mobiles (séquences d'insertion et transposons) permettant la mobilisation des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du plasmide mais aussi entre chromosome bactérien et plasmide. Ces séquences d'insertion (en particulier *ISEcpI*, *ISCrI* et *IS26*) sont celles qui ont permis le transfert de gènes

chromosomiques de *Kluyvera spp.* sur des plasmides diffusant au sein des Enterobacteriaceae ayant eu pour conséquence l'expansion mondiale des gènes *bla_{CTX-M}* comme discuté précédemment (70–74). Les transposons sont, eux, des molécules d'ADN double brin, incapables d'autoréplication mais pouvant se mobiliser d'un réplicon (plasmide ou chromosome) à un autre et/ou au sein d'un même réplicon.

La portion minimale du plasmide capable de réplication est appelée réplicon, contient l'origine de réplication (*ori*) et code pour des protéines spécifiques régulant l'initiation de la réplication se fixant sur l'*ori* et aux autres facteurs de régulation (75,76). Ce contrôle strict de la réplication implique que deux plasmides ayant le même type de réplicon ne peuvent pas être stables au sein d'une même lignée cellulaire. Ce phénomène, appelé incompatibilité plasmidique, permet de classer les plasmides en groupes homogènes appelés groupes d'incompatibilité notés Inc.

Les plasmides du même groupe d'incompatibilité sont incompatibles et ne peuvent pas exister au sein d'une même bactérie, ceux ne partageant pas les mêmes mécanismes de régulation de la réplication sont compatibles et peuvent coexister (77).

Ces propriétés ont donné naissance à la première classification plasmidique par Hedges et Datta en fonction des phages auxquels les plasmides étaient sensibles (78). L'identification plasmidique repose actuellement sur le typage de ces réplicons et cette nomenclature est toujours la plus largement utilisée (79–82). En effet ces techniques sont plus rapides et efficaces, permettant l'identification de 18 types de réplicon grâce à 5 PCR multiplex et 3 PCR simplex à la recherche des groupes FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Igamma, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, and FIIA (79). Avec les avancées des techniques de séquençage haut débit, il est actuellement possible de séquencer un plasmide en entier ce qui offre un outil potentiellement puissant. Néanmoins, il existe encore plusieurs limites à la généralisation de cette technique. Ainsi, les plasmides contenant de nombreuses séquences répétées, l'analyse est périlleuse à partir de séquençage en fragments courts (autour de 250 pb). Le séquençage par des techniques permettant l'obtention de longs fragments (> 1000bp) est essentiel pour une cartographie plasmidique mais reste cher (83,84). Les techniques récentes permettant l'obtention de fragment de plus de 10 000pb sont les plus adaptées à ces techniques de cartographie plasmidique (85–87). Deuxièmement, quand plusieurs plasmides compatibles sont présents dans la bactérie, il n'est pas toujours possible de déterminer quelle séquence appartient à quel plasmide. Une étape de conjugaison ou transformation préalable est alors indispensable. Les nouvelles techniques de séquençage par nanopore et/ou la combinaison de ces techniques de séquençage par cartographie optique à l'aide de microscopie fluorescente permettant

d'identifier les régions riches en GC pourraient à l'avenir faciliter l'analyse des plasmides mais restent encore à valider (88–90).

Comme évoqué précédemment, la détermination du groupe d'incompatibilité du plasmide présent dans une souche bactérienne est parfois compliquée par le fait que différents plasmides compatibles peuvent coexister au sein d'une même bactérie sans qu'il soit possible de prime abord de savoir lequel porte quel gène. Dans ce cas, le transfert à une autre bactérie initialement sensible par conjugaison ou transformation puis l'étude du plasmide extrait à partir de la bactérie réceptrice permet de répondre à la question. Quand ce transfert n'est pas réalisable, une pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) plasmidique peut permettre d'identifier le nombre de plasmides et leurs tailles. Pour cela, les plasmides doivent être linéarisés car ils peuvent être naturellement linéaires, circulaires ouverts ou superenroulés ce qui impacte la migration. Ils sont ensuite digérés par une nucléase S1 transformant le plasmide en de l'ADN double brin linéarisé. Après identification du fragment de taille ciblée, il peut être réalisé un Southern Blot ou une extraction de l'ADN contenu dans la bande pour réalisation de PCR (91). Ce travail de typage reste néanmoins fastidieux et n'est pas réalisé en routine. De plus, la technique de Southern Blot n'est pas assez spécifique et sous-estime la diversité plasmidique.

Les plasmides mobilisant des gènes codant pour des enzymes BLSE sont habituellement de grande taille (entre 50 et 200 kb), auto-conjugatifs et portent des mécanismes de régulation du nombre de copies et du taux de répllication (92).

Les plasmides présents dans les *Enterobacteriaceae* actuellement sont les mêmes que ceux isolés avant l'utilisation des antibiotiques (93,94). Ils diffèrent uniquement par le portage plus fréquent de gènes de résistance aux antibiotiques depuis l'utilisation large de ceux-ci.

Ainsi le gène *bla_{CTX-M-1}* a été retrouvé, dans des *E. coli* isolés en médecine humaine comme vétérinaire, associé à des plasmides du groupe d'incompatibilité IncN, proches de ceux déjà décrits comme portant le gène *bla_{VIM-1}* (95,96). Le gène *bla_{CTX-M-1}* a également fréquemment été retrouvé porté par des plasmides du groupe IncII. Les plasmides de ce groupe IncII sont caractérisés par la présence d'un cluster de gènes codant pour un pili de type IV permettant l'adhésion et l'invasion de souches *E.coli* productrices de Shiga-toxine (97). Le groupe IncII contient plus de 359 plasmides différents dont au moins 186 portent des gènes *bla_{CTX-M}*. Les plasmides de ce groupe ont aussi été retrouvés dans des bactéries isolées chez l'Homme comme chez des animaux, soulignant leur capacité de dissémination et la multiplicité des réservoirs (49,98).

Le gène *bla_{CTX-M-14}* a lui aussi été décrit dans des bactéries isolées en médecine humaine et vétérinaire mais plus fréquemment associé à des plasmides appartenant aux groupes IncK ou IncF.

Les plasmides du groupe IncF ont été particulièrement étudiés au début des années 2010 car ils sont capables de porter de multiples gènes de résistance ainsi que des facteurs de virulence. Le clone *E. coli* O25:H4-ST131 pandémique, virulent et multirésistant contenait ainsi des plasmides du groupe IncF portant plusieurs gènes de résistance (81,99). Ces plasmides du groupe IncF sont finalement ceux les plus fréquemment isolés dans les souches d'*Enterobacteriaceae* (ils ont d'ailleurs un spectre d'hôte limité à ces *Enterobacteriaceae*). Ce sont des plasmides à faible nombre de copies, faisant plus de 100kb et pouvant porter plusieurs réplicons compatibles (FII, FIA et FIB) comprenant des gènes de résistance mais aussi des facteurs de virulence (81). Les gènes codant pour des BLSE sont donc portés par des plasmides appartenant à des familles connues pour avoir un spectre large d'hôte (IncA/C), une activité répliquative forte et un pouvoir conjugatif important (IncI1 et IncN) ce qui a amplement aidé à la dissémination de ces gènes codant pour des enzymes BLSE.

Les séquences d'insertion impliquées dans la capture et la mobilisation des gènes *bla_{CTX-M}* fournissent également des promoteurs forts permettant une expression de haut niveau nécessaire pour conférer une résistance au nouvel hôte bactérien. L'ISEcp1 est retrouvée associée à des membres de tous les groupes CTX-M (37,100) et jouerait ainsi le rôle le plus important dans la capture et la mobilisation des gènes *bla_{CTX-M}*. L'étendue de l'espacement entre l'ISEcp1 et le gène *bla_{CTX-M}* en aval peut influencer le niveau d'expression du gène et par conséquent le niveau de résistance (101). L'ISCR1 a, pour sa part, été retrouvée associée avec les membres des groupes CTX-M-2 et CTX-M-9 (102). Les variants alléliques mineurs au sein de chaque groupe pourraient refléter différents événements de capture de gènes ou d'évolution post-capture ayant lieu dans des hôtes secondaires, et probablement influencés par la pression de sélection antibiotique rencontrée dans les milieux cliniques et vétérinaires (26). Enfin, les enzymes CTX-M présentant une structure hybride sont probablement dérivées d'événements de recombinaison entre des gènes des différents groupes. En effet, la coexistence de plusieurs variants CTX-M au sein d'une même bactérie a été rapportée et pourrait favoriser l'émergence de tels hybrides (103).

Les capacités de mobilisation des gènes *bla_{CTX-M}* a conduit à leur dissémination rapide chez pratiquement tous les grands groupes plasmidiques circulant au sein des entérobactéries (37,49,50,104,105). Certains de ces plasmides ont joué un rôle majeur dans la diffusion des

CTX-M, par le biais d'épidémies plasmidiques. Les exemples typiques sont la diffusion pandémique du gène *bla*_{CTX-M-15} favorisée par des plasmides IncFII (48,104), la diffusion du gène *bla*_{CTX-M-3} en Pologne et dans d'autres pays d'Europe de l'Est par des plasmides IncN (106), la diffusion du gène *bla*_{CTX-M-65} en Chine par des plasmides de type F33:A-B (107), et la diffusion de gène *bla*_{CTX-M-14} en Espagne et au Royaume-Uni par des plasmides IncK (108–110). De façon générale, les génomes bactériens sont à considérer comme un ensemble extrêmement dynamique propice à la diffusion de gènes entre bactéries dont des gènes de résistance aux antibiotiques.

1.3.2 Dissémination clonale

En plus de cette dissémination plasmidique, les plasmides portant des gènes codant pour des enzymes de résistance BLSE se sont parfois intégrés dans clones bactériens « hypervirulents ». Ces clones, le plus souvent suite à l'apport de facteurs de virulence antérieurement ou concomitamment à celui des gènes de résistance, ont eu la capacité de se multiplier et de s'implanter dans de nombreux environnements tout en conservant le plasmide portant la résistance de type BLSE. De ce fait, ces clones bactériens peuvent assurer la dissémination par transmission verticale par transmission des bactéries « mères » aux bactéries « filles » lors de leur multiplication mais également par transmission horizontale car l'accroissement du nombre de bactéries accroît la probabilité de transfert (53). L'étude de la diffusion clonale s'est faite par « multilocus sequence typing » (MLST), « pulsed-field gel electrophoresis » (PFGE), « amplified fragment length polymorphism » (AFLP) ou « multi-locus variable tandem repeat number analysis » (MLVA). La MLST, qui analyse les variations de séquence de gènes de ménage, est adaptée pour les études d'évolution mais manque de pouvoir discriminatif pour analyser la clonalité lors d'une épidémie (111,112). La PFGE, qui analyse les patterns de migration des fragments du génome après restriction, a l'avantage d'avoir un plus grand pouvoir discriminatif mais est plus longue et nécessite un équipement encombrant (113–115). La détection d'empreinte génétique par PCR (ou détermination des polymorphismes) a été longtemps été une méthode plébiscitée mais ces techniques ne sont que peu reproductibles entre les laboratoires à l'exception de l'AFLP. L'automatisation de ces techniques a permis d'en améliorer la reproductibilité (116,117). Enfin, le pouvoir discriminatif de la MLVA, qui détermine le nombre de répétitions de séquences à différents *loci*, varie en fonction des *loci* choisis ce qui permet d'adapter la précision (et la lourdeur de manipulation en fonction du nombre de *loci*) à la question posée (118–120). Le choix de la technique utilisée est donc

essentiellement guidé par la question posée. En cas de recherche de transmission croisée, un pouvoir discriminatif élevé est nécessaire et la PFGE est souvent privilégiée. Néanmoins, en cas de nécessité de réponse rapide ou en cas de grands nombres d'isolats à étudier comme lors de l'étude de la dissémination entre pays, la PFGE ne peut être utilisée et des approches de typage par PCR peuvent être utilisées. Le développement des techniques de séquençage haut débit devraient également permettre l'analyse complète des génomes pour disséquer plus finement les mécanismes et les facteurs de virulence impliqués dans cette dissémination clonale (121–123).

Ces techniques ont permis d'identifier certains clones ayant grandement favorisé la dissémination mondiale des E-BLSE.

Parmi les exemples les plus emblématiques, on peut citer la pandémie à *E. coli* clone ST131 (groupe phylogénétique B2), associé à l'enzyme CTX-M-15 (124–127). Ce clone, hypervirulent avec une expansion mondiale, est reconnu par PCR du gène *pabB* (128,129). La PFGE a permis d'identifier plusieurs variants portant des facteurs de virulence différents au sein de ce clone avec des pouvoirs de dissémination différents (48,115,125,130–132). *A contrario*, les 5 souches d'*E. coli* les plus fréquemment porteuses de CTX-M initialement isolées au Royaume-Uni étaient différentes en PFGE mais le fait qu'elles appartenaient toutes au clone ST131 ne fut identifié que plusieurs années ensuite par MLST (115,133). Cet exemple illustre bien la complémentarité des informations apportées par ces différentes techniques. Les autres principaux complexes clonaux sont STC405 et STC38 (groupe phylogénétique D) d'*E. coli* associés aux enzymes du groupe CTX-M-9 (principalement CTX-M-14 et CTX-M-9) et à CTX-M-15 (134). Enfin, *E. coli* ST10 (groupe phylogénétique A) a été récemment associé à la diffusion de plusieurs groupes d'enzymes de type CTX-M (groupes CTX-M-1, CTX-M-2 et CTX-M-9) (108,135–139).

Chez *K. pneumoniae*, des souches du complexe clonal 11 ont été associées à la diffusion d'enzymes de type CTX-M-15 et CTX-M-14 (140–142). Néanmoins, l'analyse par MLST a identifié plus de 40 complexes clonaux parmi 67 souches isolées ce qui a remis en question le dogme de la diffusion massive de quelques clones porteurs de BLSE chez *K. pneumoniae* mais a plutôt été en faveur d'une émergence globale de différents clones porteurs de ces gènes de résistance (111). En revanche, il semble que certains clones virulents de *K. pneumoniae* soient en partie responsables de la diffusion des gènes codant pour des carbapénèmases, problématique hors du spectre de cette thèse (143–145).

1.3.3 Dissémination en réanimation et mesures de prévention

Cette dissémination clonale a longtemps été le moteur principal de la dissémination des E-BLSE en réanimation entraînant une mortalité accrue ainsi que des durées et des coûts d'hospitalisation importants (146). Par conséquent, les premières épidémies clonales d'E-BLSE ont eu pour réponse la mise en place de précautions complémentaires contact en hygiène pour les patients porteurs d'E-BLSE après dépistage systématique à l'admission et plus ou moins dépistage hebdomadaire lors du séjour en réanimation. Devant l'émergence des E-BLSE dans la communauté (développée dans le paragraphe 1.3.5) et une frontière moins marquée avec le développement de soins en ville, la pertinence de ces précautions complémentaires a été remise en cause. Le renforcement et l'application systématique de précautions standards de bon niveau semblent avoir la même efficacité dans le contrôle de la transmission manu-portée des E-BLSE avec un coût plus faible et moins d'effets secondaires pour les patients. L'impact d'un dépistage systématique et des mesures de contrôle de la dissémination des E-BLSE en réanimation ont également été discutés dans la revue systématique publiée dans *Critical care* (en Annexe n°2 pages 162-174).

1.3.4 Autres mesures de maîtrise de la résistance aux antibiotiques : maîtrise de l'antibiothérapie

Un autre moyen de limiter la dissémination hospitalière des E-BLSE pourrait être de diminuer la consommation d'antibiotiques. La causalité de la pression de sélection des antibiotiques a été montrée pour les résistances créées par des mutations (évolution d'une TEM en TRI, résistance aux fluoroquinolones par mutation des topo-isomérases, résistance à la rifampicine ou aux macrolides, ...). Un lien de corrélation mais sans causalité formelle a pu être prouvé pour la sélection de résistance pré-existante comme les BLSE ou les carbapénèmases et l'utilisation respectivement des C3G et des carbapénèmes. Devant l'augmentation préoccupante des niveaux de résistance, un principe de précaution s'est ajouté à cette corrélation, ce qui a conduit les autorités de santé à essayer de maîtriser au mieux la prescription des antibiotiques. De nombreuses campagnes ont été lancées, à destination du grand public, des médecins libéraux et aussi des médecins hospitaliers. Ces campagnes ont eu une efficacité limitée en France puisqu'elles n'ont pas permis de faire baisser l'utilisation des antibiotiques (<https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/country-overview>).

Depuis 2015, dans le cadre du plan antibiotique, une nouvelle campagne de lutte contre l'antibio-résistance à l'hôpital a été lancée : « les antibiotiques juste ce qu'il faut » dans le but de préserver l'efficacité des antibiotiques et de limiter l'émergence des bactéries multirésistantes. Les médecins sont ainsi incités à limiter l'usage des antibiotiques aux situations nécessaires, à limiter les durées de traitement, à réévaluer systématiquement les prescriptions d'antibiotiques et à avoir recours à un avis spécialisé auprès d'un infectiologue.

Concernant plus spécifiquement les réanimations, une étude analysant les pratiques de 113 réanimations françaises sur les 3 premiers mois de 2018 a démontré que ces stratégies d'épargne antibiotique devaient encore être largement améliorées puisque seulement la moitié des traitements empiriques non justifiés étaient ensuite arrêtés. De plus, seulement 57% des hémocultures prélevées étaient mises en culture la nuit ou les week-ends (147).

Dans cette perspective d'épargne globale des antibiotiques, en particulier les antibiotiques de derniers recours, les patients colonisés à E-BLSE posent un défi thérapeutique à la fois à la phase empirique et documentée. En effet, le traitement de première ligne en cas d'infection suspectée ou prouvée à E-BLSE repose souvent sur l'utilisation de carbapénèmes sans que les recommandations n'aient pu trancher en l'absence de donnée scientifique de bon niveau de preuve (148). Le problème posé est que les carbapénèmes sont des antibiotiques de dernière ressource et que leur utilisation a conduit à la sélection d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (149). Cette situation amène d'ores et déjà à des situations d'impasse thérapeutique (150,151). Il apparaît dès lors primordial d'épargner au maximum l'utilisation des carbapénèmes d'autant plus que les E-BLSE peuvent garder une sensibilité à certaines bêta-lactamines (cefoxitine, témocilline, ceftazidime, céfépime, pipéracilline-tazobactam), à certains aminosides voire au triméthoprime-sulfaméthoxazole.

Les stratégies d'épargne des carbapénèmes peuvent avoir lieu lors du traitement après obtention de la documentation microbiologique. Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) et les bactériémies sont les deux infections nosocomiales les plus fréquentes en réanimation. Les rares études sur le sujet se sont donc concentrées sur ces infections. Concernant les PAVM à E-BLSE, une étude monocentrique rétrospective a comparé les céphalosporines de 3^{ème} génération et les associations pénicilline – IBL (dont fait partie la pipéracilline-tazobactam) aux carbapénèmes (152). Cette étude ne retrouvait pas de différence de mortalité ni de guérison de l'épisode infectieux entre les 2 groupes de traitement malgré un taux inférieur d'antibiothérapie adaptée dans le groupe céphalosporines de 3^{ème} génération.

Concernant les bactériémies à E-BLSE, une large étude multicentrique est restée négative ne parvenant pas à prouver la non-infériorité de la pipéracilline-tazobactam comme traitement documenté par rapport au méropénème (153) mais plusieurs biais de l'étude en limitent l'interprétation comme discuté par notre équipe (154) et par d'autres équipes (155,156). En premier lieu, cette étude n'a pas prouvé la supériorité du méropénème et doit donc être considérée comme une étude négative. Deuxièmement, les modalités d'administration de la pipéracilline-tazobactam par perfusions courtes de 30 minutes ne permettent pas d'optimiser les paramètres pharmacocinétiques de l'antibiothérapie. Troisièmement, les infections étaient causées, dans 12% des cas, par des β -lactamases de type AmpC non sensibles à la pipéracilline-tazobactam alors que ces patients non E-BLSE auraient pu être exclus comme l'étude s'intéressait au traitement documenté et non au traitement probabiliste. Enfin, la mortalité était supérieure chez les patients ayant eu une antibiothérapie probabiliste comparés aux patients ayant reçu une antibiothérapie probabiliste inadaptée. Les traitements probabilistes utilisés ainsi que les stratégies, chirurgicales ou non, de contrôle de la porte d'entrée de la bactériémie n'étaient pas précisés. Cette discussion sur les résultats de cette étude a pu être valorisée par notre équipe avec une publication d'une lettre dans le Journal of the American Medical Association (en Annexe n°3 pages 175-178). Les associations ceftazidime-avibactam et ceftolozane-tazobactam semblent également pouvoir être utiles pour épargner les carbapénèmes avec un avantage pour la ceftazidime-avibactam en situation de traitement d'infection à E-BLSE, lorsqu'aucune alternative n'est possible (157). Malheureusement, ces molécules sont très proches chimiquement des céphalosporines déjà existantes et l'émergence de résistances par mutation d'AmpC ou production de porines d'imperméabilité a déjà été décrite sous traitement (158,159). En conséquence, une émergence rapide de clones résistants est à craindre, ce qui, en plus de leur coût, incite à utiliser ces molécules avec parcimonie.

Les stratégies d'épargne des carbapénèmes pourraient également avoir lieu à l'étape du traitement probabiliste. Les patients colonisés par les E-BLSE sont plus à risque d'infections par E-BLSE que les non colonisés et il a donc été proposé de guider le traitement probabiliste des infections acquises en réanimation en fonction du statut de colonisation. Néanmoins, le taux d'infection à E-BLSE reste faible (autour de 15 à 20%) chez les patients colonisés (11,160,161). Les facteurs de risque identifiés de PAVM à E-BLSE sont le fait d'être colonisé par une *K. pneumoniae* [OR : 60.6; (IC95% 56.33-578.73)] et/ou un *Enterobacter sp.* [OR 10.96 (IC95% : 2.93-41.0)] et un score de SAPS II à l'admission supérieur à 43 [OR 2.81 (IC95% : 1.16-6.79)] (162,163). Malgré l'identification de ces facteurs de risque, la prédiction individuelle par

patient de la survenue d'une PAVM à E-BLSE reste très difficile même chez les patients colonisés.

Plusieurs études se sont donc intéressées à la valeur prédictive de la colonisation digestive par E-BLSE. Une première étude a évalué le pronostic de la colonisation digestive sur la colonisation pulmonaire à E-BLSE trouvant une valeur prédictive négative (VPN) excellente [99.2% (IC95% : 98.7;99.6) avant 5 jours de ventilation et 93,4% (IC95% : 91.9;95.0) après 5 jours) mais une valeur prédictive positive (VPP) médiocre [14.5% (IC95% : 12.8; 16.3) et 34.4% (IC95% : 31.4; 37.4) respectivement avant et après 5 jours de ventilation mécanique] (164). De plus, colonisation pulmonaire n'est pas synonyme d'infection pulmonaire. Une étude rétrospective a montré une VPP de 41,5% et une VPN de 99,4% de la colonisation digestive à E-BLSE pour la survenue de PAVM à E-BLSE résultat confirmé par une autre équipe (VPP : 43,6%, VPN : 97,3%) (165,166). Ces excellentes valeurs prédictives négatives renforcent le fait de ne pas prescrire de carbapénèmes aux patients non porteurs de E-BLSE mais les VPP médiocres n'aident pas à décider du traitement probabiliste adéquat chez ces patients porteurs d'E-BLSE.

Très peu d'études se sont intéressées au traitement probabiliste des infections chez les porteurs d'E-BLSE ; en particulier aucune étude prospective n'existe pour les PAVM. L'étude rétrospective abordant ce sujet ne retrouvait pas de différence en terme de durée de ventilation mécanique, de durée de séjour en réanimation ni de taux de mortalité en réanimation (55.8% vs 50%, $p = 0.48$) entre les PAVM à E-BLSE comparées aux PAVM non à E-BLSE (166). Les études rétrospectives ayant étudié l'impact du traitement probabiliste dans les bactériémies à E-BLSE ne retrouvent pas non plus d'augmentation de la mortalité en fonction de la couverture microbiologique de ce traitement probabiliste (167–169) ce qui est extrêmement rassurant quant à l'inocuité d'une telle stratégie. Le pronostic de ces infections était essentiellement déterminé par des facteurs liés à l'hôte ; ce qui suggère que le portage d'une E-BLSE est probablement le reflet d'une fragilité de l'hôte (170). Le microbiote intestinal étant également corrélé à la condition de l'hôte, il pourrait expliquer en partie cet état de fait. Ce point sera abordé dans la 2^{ème} partie de l'introduction.

Au vu des données décrites précédemment, il apparaît logique de s'interroger s'il ne serait pas possible d'épargner l'utilisation de carbapénèmes lors de l'antibiothérapie probabiliste des PAVM survenant chez les patients colonisés au niveau digestif par des E-BLSE en ayant une stratégie d'usage systématique de la pipéracilline-tazobactam.

Cette interrogation est renforcée par les résultats d'une étude ayant évalué l'arrêt du dépistage systématique de la colonisation digestive par E-BLSE, dépistage étant censé guidé cette

utilisation de carbapénèmes. Ces résultats suggèrent que cette stratégie pourrait permettre de diminuer la consommation de carbapénèmes (75 vs 61 jour-carbapénème pour 1000 patient-jours, $p : 0,01$) sans effet ni sur la survenue d'infections à E-BLSE [OR ajusté : 1.16 (IC95% : 0.38-3.50), $p = 0.79$] ni sur la mortalité en réanimation [SHR : 1.22 (IC95% : 0.93-1.59), $p = 0.15$] (171). Néanmoins, ces résultats provenaient d'une étude de cohorte avant-après monocentrique et doit être confirmée par des études de plus haut niveau de preuve. Ces discussions ont été développées dans la revue systématique publiée dans *Critical care* (en Annexe n°2 pages 162-174).

A court terme, le développement de tests de diagnostic rapide de la présence ou non d'une enzyme BLSE semble l'approche la plus prometteuse pour adapter l'antibiothérapie probabiliste chez les patients en réanimation ou pour permettre une désescalade rapide. Ces tests se basent le plus souvent sur des milieux chromogéniques pour détecter rapidement l'hydrolyse des C3G (172). Il est également possible de tester la sensibilité aux antibiotiques directement sur le prélèvement et non une fois après isolement de la souche infectante. Cette approche a été utilisée par notre équipe sur des liquides de LBA (173,174). Enfin, des outils de détection moléculaire des gènes codant pour les BLSE ont récemment été développés. Leur pertinence dans la prise en charge clinique doit encore être démontrée mais tous ces outils semblent des pistes prometteuses pour adapter au mieux l'antibiothérapie (172).

Enfin, une autre stratégie pour diminuer la pression de sélection liée aux antibiotiques a été d'effectuer des rotations d'antibiothérapie ou des restrictions d'utilisation des C3G en réanimation mais cette approche a eu des résultats mitigés. L'utilisation de la pipéracilline-tazobactam en remplacement des C3G, générant une pression de sélection différente mais réelle, pourrait en être l'explication selon les auteurs (175,176).

1.3.5 Dissémination environnementale

Non contentes de disséminer au sein des structures de soins, ces E-BLSE sont également largement retrouvées dans l'environnement avec des taux de portage digestif de personnes non hospitalisées dans la communauté entre 3 et 60% en fonction des pays (177). L'acquisition d'E-BLSE ne se fait donc plus uniquement à l'hôpital ou en institution mais également dans la communauté et dans l'environnement (Figure 4). Cette dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques de façon endémique est aujourd'hui devenu un problème de santé publique

majeur. Cette antibiorésistance a causé la mort de 33 000 personnes en Europe en 2015 (178) et 10 millions décès par an directement liés à cette antibiorésistance sont attendus dans le monde en 2050 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (179).

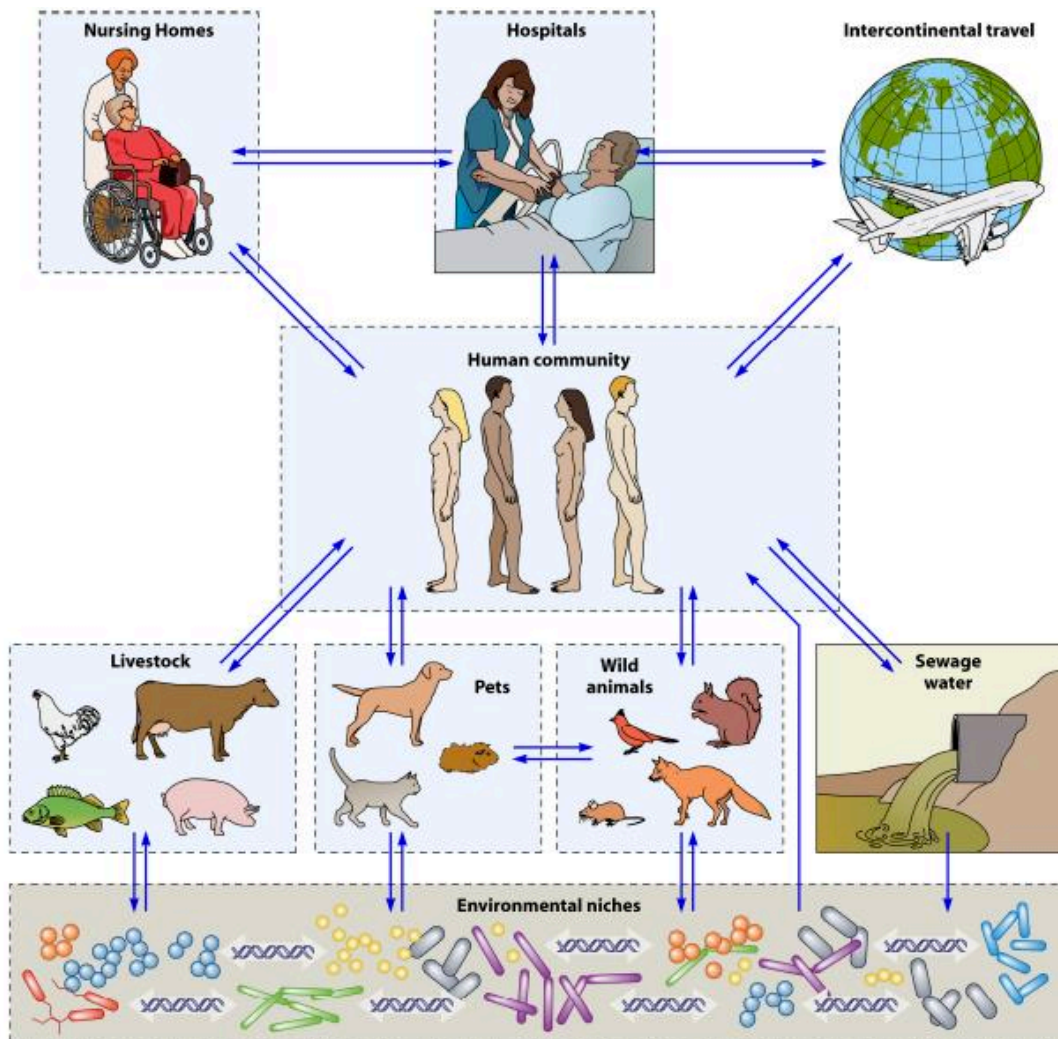


Figure 4 : Principaux réservoirs d'E-BLSE participant à la dissémination globale des E-BLSE. Les flèches signalent les flux entre les différents réservoirs (54).

L'émergence récente du concept « One Health » faisant enfin le lien entre exposition globale environnementale et exposition hospitalière sur la pression de sélection a amené à reconsidérer le problème dans sa globalité. La maîtrise des eaux usées (hospitalières, des usines de production d'antibiotiques, des personnes dans la communauté sous antibiothérapie), la maîtrise de la consommation d'antibiotiques en médecine vétérinaire et en production agro-alimentaire et la consommation d'antibiotiques en médecine humaine (de ville et hospitalière) sont les mêmes pendants d'un problème global dont aucun volet ne saurait être négligé (180).

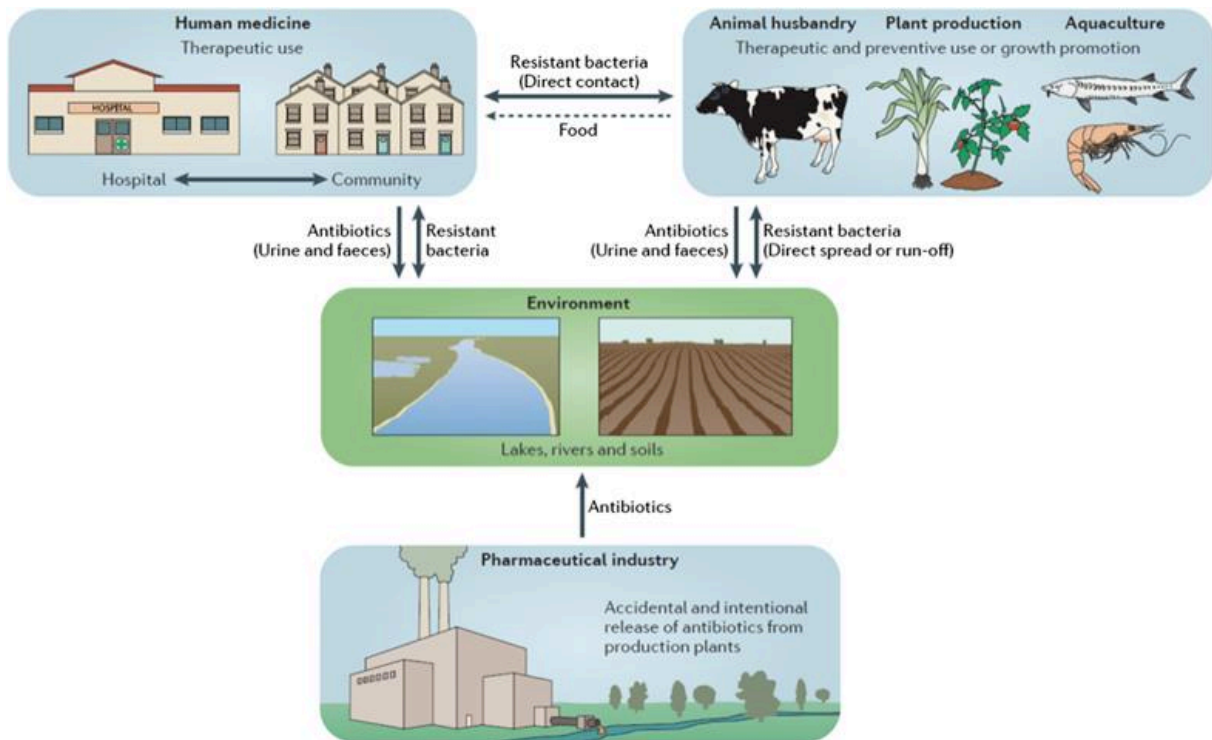


Figure 5. Ecosystème intégré aboutissant à la dissémination de l'antibiorésistance et illustrant l'importance du concept « One Health » (Andersson *et al.*, 2014 (181))

Le concept de « Global Health » remet la dissémination des E-BLSE en perspective sur une échelle mondiale. En effet, les perturbations météorologiques, la mobilité de personnes (conflits et réfugiés, commerce, tourisme) et les migrations animales participent également à la dissémination des E-BLSE (1). Par exemple, des E-BLSE ont été isolées dans les fécès de certains oiseaux migrateurs. Ceux-ci se sont probablement contaminés dans l'environnement de leur lieu de départ (« One Health »). Au cours de leur migration, ils vont traverser de nombreux pays et peuvent donc y contaminer l'environnement en y disséminant des E-BLSE (« Global Health »). Il est ensuite possible que des humains soient contaminés soit par contact direct soit *via* l'ingestion de culture ou de viande contaminée par l'environnement (« One Health ») (Figure 6) (1).

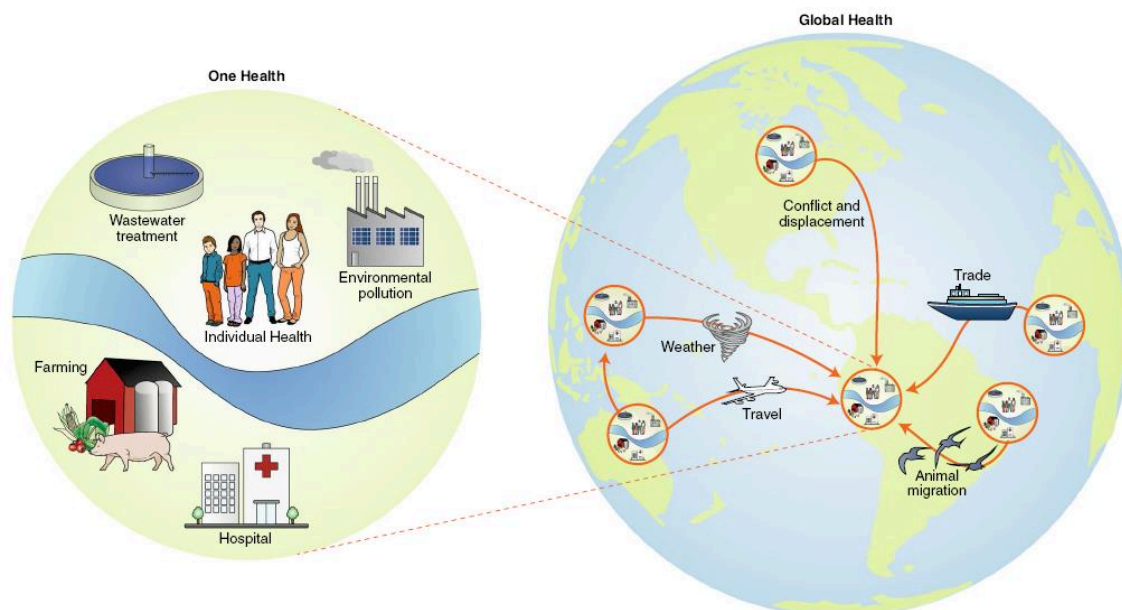


Figure 6 : Prise en compte des concepts « One Health » and « Global Health » dans la lutte contre l'antibiorésistance (1).

Les politiques de santé publique visant à contenir les bactéries résistantes aux antibiotiques doivent donc impérativement considérer, en plus de l'échelle individuelle, ces échelles d'environnement local et d'intégration globale pour être efficaces. Des mesures « écologiques », en plus des mesures d'épargne des antibiotiques et d'hygiène hospitalière, sont nécessaires à l'échelle locale et globale. Des mesures « écologiques » à l'échelle individuelle sont également requises, l'environnement individuel étant constitué par le microbiote intestinal.

1.3.6 Dissémination au sein d'un autre environnement : le microbiote

Les E-BLSE se sont donc répandues dans l'environnement avec 2 facteurs favorisant. Le premier est un inoculum de contamination de l'environnement plus important (plus de patients porteurs éliminant plus d'E-BLSE dans l'environnement). Le second tient en la présence accrue d'antibiotiques dans l'environnement due à l'augmentation de l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire ainsi que par le déversement des eaux usées des usines de production. Cette augmentation de la présence d'antibiotiques dans l'environnement a éliminé un certain nombre de bactéries initialement présentes et qui arrivaient à limiter la colonisation environnementale par les E-BLSE. Ces E-BLSE, avec différents clones impliqués, ont alors eu un avantage sélectif leur permettant de coloniser cet environnement « pollué » d'antibiotiques. Il en va probablement de même dans leur environnement au sein du tube digestif humain constitué principalement du microbiote intestinal.

2) Microbiote et dissémination des E-BLSE

2.1. Généralités sur le microbiote intestinal

L'existence d'une flore intestinale est connue depuis longtemps. Cependant, le fait que seulement 20% environ des bactéries composant classiquement cette flore soient cultivables en a limité l'exploration. L'amélioration des techniques de culture a donné naissance à la culturomique qui a permis de cultiver de nouvelles bactéries et plus récemment de nouveaux champignons (182,183). Néanmoins, c'est l'essor des technologies de séquençage s'affranchissant des techniques de culture qui a permis d'étudier plus avant cette flore intestinale. Les techniques de séquençage haut débit ont permis de découvrir la présence de bactéries jusque-là insoupçonnées, principalement anaérobies, constituant le microbiote intestinal.

Le microbiote a depuis été défini comme l'ensemble des microorganismes présents au sein de l'organe d'un individu ou au sein d'un environnement. Il se compose de bactéries mais aussi de champignons, de virus, d'archées ou encore d'organismes eucaryotes comme les helminthes. Le microbiome est l'ensemble du matériel génétique présents dans les microorganismes composant le microbiote.

Le compartiment du microbiote le plus étudié est celui bactérien. Par abus de langage, il est appelé microbiote alors que bactériobiote serait probablement plus approprié. Initialement, le nombre de bactéries présentes dans le microbiote était évalué comme étant supérieur à celui de cellules humaines dans l'organisme. Un article récent, utilisant des méthodes plus précises, a estimé le nombre total de bactéries hébergées par un adulte de 70kg à $3,8 \cdot 10^{13}$, avec une masse estimée à 200 grammes (0,3% de la masse totale). Le nombre total de cellules humaines, dominées par les lignées hématopoïétiques, était évalué à $3,0 \cdot 10^{13}$. Cette étude a remis en question le dogme d'une nette supériorité numérique des bactéries par rapport aux cellules humaines, en montrant que les deux types cellulaires étaient numériquement équivalents (184).

Néanmoins, le nombre de gènes bactériens au sein du microbiome est très largement supérieur aux nombre de gènes du génome humain (plusieurs millions contre environ 23 000 gènes humains soit un rapport 150/1) (185).

Le compartiment mycologique, appelé mycobiote, est relativement méconnu car il est minoritaire au sein de l'écosystème digestif et a donc été étudié plus tardivement (186). De

plus, les méthodes d'analyse du mycobiotome sont encore moins standardisées que celle du microbiote bactérien. Néanmoins, le mycobiotome digestif semble récapituler un certain nombre d'effets du microbiote digestif (187,188) et son rôle en santé et en pathologie est de plus en plus évident (189,190).

Le microbiote viral, appelé virobiote, a été encore moins étudié en raison de problèmes techniques majeurs. En effet, la diversité des structures de support de l'information (ADN simple brin ou double brin, circulaire ou non, ARN, ...), l'absence de région conservée à amplifier et le fait que le génome humain soit constitué à au moins 50% d'éléments génétiques d'origine virale acquis durant l'évolution rendent son étude extrêmement complexe (191). Il semble composé d'environ 90% de bactériophages (192) de l'ordre des *Caudovirales* même si la majorité des espèces est inconnue (193). De façon intéressante, la composition du virobiote semble varier concomitamment avec les compositions des compartiments bactérien et fongique du microbiote (194).

Concernant les Archées, il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'élément faisant suspecter un rôle en pathologie humaine même si leur étude reste extrêmement parcellaire (195).

2.2. Rôles physiologiques du microbiote intestinal

Le microbiote semble jouer un rôle dans tellement de fonctions physiologiques humaines que le concept d'holobionte a aujourd'hui émergé. Cet holobionte humain désigne l'entité formée par les cellules humaines et le microbiote au sein d'un « super-organisme » humain.

Ainsi, le microbiote est impliqué dans plusieurs fonctions majeures nécessaires à la survie de l'hôte humain.

En premier lieu, le microbiote influence des fonctions métaboliques telles que la balance énergétique, l'équilibre glycémique et la sensation de satiété (196,197). La dégradation des nutriments par le microbiote permet d'apporter 5 à 10% de sa consommation énergétique à l'hôte humain (198). Le microbiote peut aussi aider au métabolisme des sels biliaires (199) et permettre la synthèse de vitamines, comme la vitamine K (200).

En second lieu, le microbiote est impliqué dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire (201–203). Le microbiote est ainsi capable de conférer une protection directe par compétition entre micro-organismes ou indirecte par stimulation de l'immunité de l'hôte avec une action locale ou à distance définissant le concept de co-immunité (204).

En plus de ces rôles, le microbiote pourrait influencer la prolifération cellulaire (205), la vascularisation (206), moduler le développement synaptique cérébral (207), l'activité de la microglie (208) et la signalisation cérébrale (209), prédisposer à des maladies psychiatriques comme l'autisme ou la schizophrénie (210), réguler des fonctions endocrines (211,212), ... De nombreuses autres implications du microbiote en santé humaine restent probablement encore à découvrir.

2.3. Notion de dysbiose

Le terme, actuellement à la mode, de dysbiose est aujourd'hui employé très diversement. Il est communément accepté comme une composition d'un microbiote différant de la normale et associée à un état pathologique. Le problème est, d'une part, qu'il n'existe pas de définition d'un microbiote normal et, d'autre part, que la définition de la composition d'un microbiote est extrêmement variable (charge bactérienne totale, abondances absolue ou relative, présence ou absence d'espèces(s) particulière(s), α ou β diversité). Ce terme est donc probablement à éviter pour lui préférer une description précise des différences observées (213).

Ainsi, en situation d'homéostasie, le microbiote est composé d'organismes variés dont certains sont bénéfiques pour le développement et la santé de l'hôte. Sous l'effet de perturbations environnementales (traitement antibiotique, régime alimentaire, ...) ou endogènes (état inflammatoire, perturbations de l'immunité, ...), l'écosystème microbien peut se trouver perturbé, perdant potentiellement des organismes bénéfiques ou voyant le développement d'organismes commensaux au potentiel délétère (pathobiontes) voire de pathogènes. Ces perturbations jouent probablement un rôle soit déclencheur soit d'entretien dans l'installation d'un certain nombre de pathologies.

Ainsi le maintien d'un état stationnaire hors équilibre de la composition du microbiote intestinal est considéré critique pour la santé de l'organisme au sein duquel il se développe, l'être humain dans notre situation. Cet état stationnaire est la résultante des innombrables interactions de coopération et/ou de compétition qui modulent les réseaux de coopération entre les différents micro-organismes présents et avec l'hôte (214). Ces réseaux de coopération confèrent une capacité de résilience au microbiote permettant une oscillation autour de l'état stationnaire sans sortir des limites de l'homéostasie (215). En cas de dépassement des capacités de résilience, un nouvel état stationnaire hors équilibre est alors atteint, associé ou non à un état pathologique de l'hôte (Figure 7).

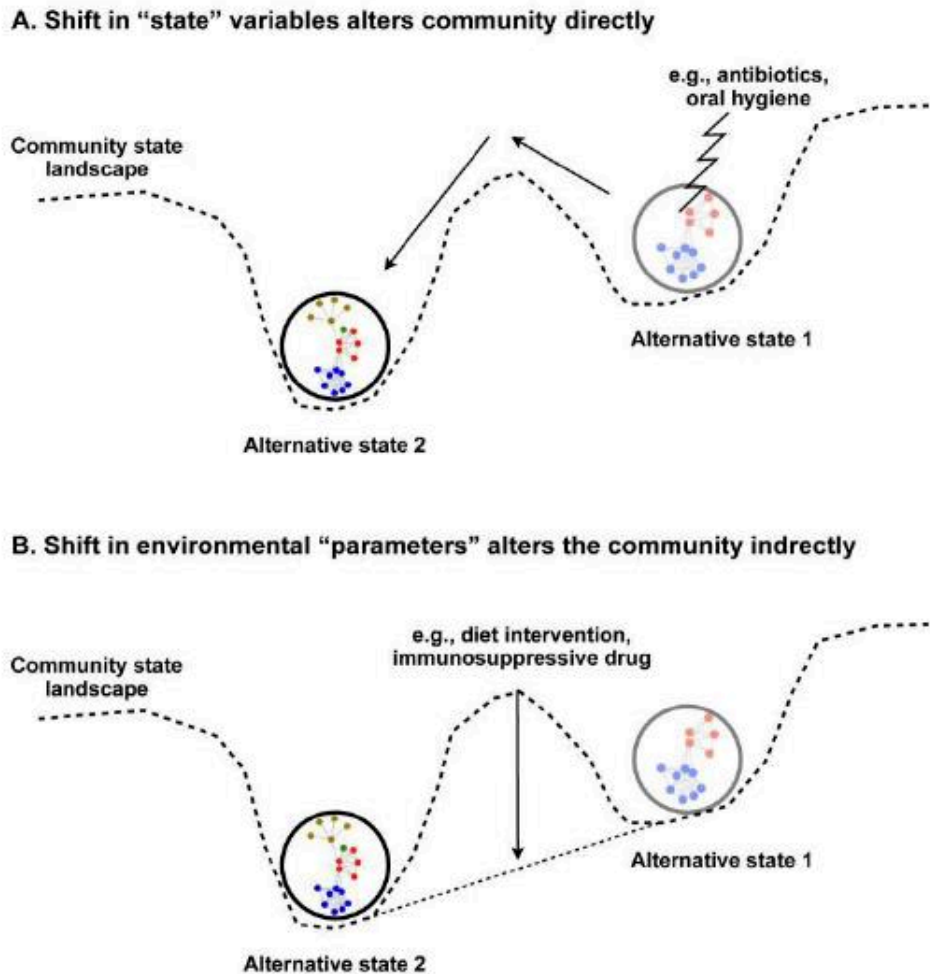


Figure 7 : Représentation schématique du “paysage de stabilité” de la composition du microbiote intestinal. La balle représente la composition du microbiote intestinal et le déplacement horizontal de la balle représente les changements de composition. La profondeur des « vallées » représente la probabilité que la composition se maintienne dans son état initial malgré des perturbations mineures et donc sa stabilité. La perturbation peut modifier la composition A. directement en modifiant la répartition des microorganismes ou leur activité B. indirectement en changeant les paramètres environnementaux. Dans les deux cas la composition peut être modifiée et atteindre un état stable différent (Costello *et al.*, 2012 (216)).

2.4. Facteurs de variabilité du microbiote intestinal

Les facteurs affectant la composition du microbiote intestinal sont extrêmement nombreux.

Les facteurs endogènes sont le terrain génétique, la réponse immunitaire et l’âge (217,218).

Au-delà des facteurs exogènes décrits ci-après, les facteurs endogènes exercent un impact continu mais d’intensité variable au cours du temps sur la composition du microbiote.

Les facteurs exogènes comprennent, eux, le mode d’accouchement (219), l’alimentation et ce dès la période de l’allaitement (220), les médicaments dont les antibiotiques (221,222), les expositions à des microorganismes qu’elles soient responsables d’infections ou non (223,224),

le rythme circadien (225), le rythme du transit (226) ou encore le degré d'activité physique (227). Leur poids relatif sur la composition du microbiote est encore sujet à débat.

La première étape de colonisation du tractus digestif pourrait se produire *in utero* avant même l'accouchement (228). Entre l'âge de 1 et 5 ans (après arrêt de l'allaitement), la diversité du microbiote augmente rapidement puis se maintient jusqu'à la préadolescence, période à laquelle la diversité augmente de nouveau pour atteindre un état stationnaire vers l'âge de 12 ans.

A l'échelle des phyla, le microbiote intestinal adulte est stable, mais à l'échelle des espèces et des sous-espèces (souches) on observe une variabilité interindividuelle majeure. La composition du microbiote d'un individu est unique, on parle de « code-barre microbital ». Cependant, du point de vue fonctionnel, il existe une relative homogénéité entre les personnes non atteintes de pathologie (229).

Avec l'âge, la composition du microbiote devient moins diversifiée avec une perte progressive des capacités de résilience, ce qui coïncide avec la survenue des pathologies liées à l'âge ainsi qu'avec une baisse de l'immunocompétence (230).

2.5. Microbiotes et réanimation

L'étude de l'impact potentiel du microbiote sur la prise en charge en réanimation est récente, datant majoritairement de moins de 10 ans. Ses rôles potentiels restent encore mal compris mais pourraient toucher plusieurs domaines.

2.5.1. Impact de la réanimation sur le microbiote intestinal

Les interactions hôte/microbiote sont des interactions bi-directionnelles et la condition de l'hôte a une influence directe sur la composition du microbiote. Plusieurs études ont montré une perte de diversité du microbiote digestif au cours d'un séjour en réanimation avec une expansion des *Proteobacteria* au détriment des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* commensaux ainsi que des Actinobactéries productrices de butyrate (métabolite anti-inflammatoire) comme *Akkermansia spp.* (231,232). Cependant, il existe une vaste variabilité inter-individuelle dans ces variations (233) probablement expliquée par « l'état » du microbiote avant l'admission en réanimation, la sévérité de la pathologie, les traitements reçus, ...

L'impact de la réanimation sur le microbiote est médié par de nombreux mécanismes (234). Les facteurs endogènes les plus décrits sont une production accrue d'opioïdes et de catécholamines endogènes, une diminution de la concentration en acides biliaires, des perturbations de la motricité intestinale et une perte de l'intégrité épithéliale digestive. Les facteurs exogènes comprennent bien évidemment les traitements antibiotiques mais aussi les inhibiteurs de la pompe à protons, la nutrition entérale ou la mise à jeun, les produits sédatifs et analgésiques et enfin les catécholamines utilisées. Les modifications du microbiote intestinal ont des conséquences extrêmement larges. Au niveau pulmonaire, on constate par exemple une diminution de la migration des cellules dendritiques. Ces perturbations du microbiote entraînent également une diminution de la synthèse d'immunoglobulines, de la production de neutrophiles au sein de la moelle osseuse, des modifications d'activité des macrophages, lymphocytes T, ... ainsi que des modifications de l'immunité muqueuse. Toutes ces perturbations entraînent une sensibilité accrue aux infections ou des états pro-inflammatoires systémiques (235).

2.5.2. Microbiotes et inflammation en réanimation

Cet état pro-inflammatoire systémique pourrait favoriser le développement d'un sepsis au cours d'une infection (236) ou participer au retard de sa résolution. Ainsi, quelques cas d'amélioration d'un syndrome de défaillance multi-viscérale après transplantation fécale ont été décrits (237–239). Néanmoins, les données sont très préliminaires et de nombreux travaux sont nécessaires avant de généraliser la modulation du microbiote dans cette indication. Le concept de syndrome post-réanimation est en train d'émerger avec, parmi ses composantes, un épuisement immunitaire médié, entre autres, par la surexpression de PD-1 et PD-L1 (240,241). Une première étude de phase I a évalué les anticorps anti-PD-1 (nivolumab) dans cette indication avec des résultats encourageants (242). Il est bien établi en oncologie que l'efficacité de ces anticorps est influencée par la composition du microbiote (243–246). Si les résultats de cette étude de phase I se confirment, une modulation du microbiote serait potentiellement intéressante pour moduler l'efficacité de ces traitements.

Le microbiote digestif a également un effet sur le degré d'inflammation d'organes à distance, en particulier dans le poumon. Cette influence à distance est décrite sous le terme d'axe « intestin – poumon ». De nombreuses maladies respiratoires chroniques comme l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive ou la mucoviscidose sont associées à des modifications du microbiote digestif. De plus, la composition du microbiote digestif influe sur

celle du microbiote respiratoires. Concernant les pathologies inflammatoires pulmonaires aiguës, plusieurs auteurs suggèrent un rôle pour le microbiote pulmonaire dans le syndrome de détresse respiratoire (SDRA) mais peu d'études expérimentales sont disponibles (247). Une de ces rares études a néanmoins identifié la composition du microbiote pulmonaire comme prédictif de la survenue de SDRA non infectieux chez les polytraumatisés (248).

En plus de son action pro- ou anti-inflammatoire, la composition du microbiote semble jouer un rôle dans la colonisation digestive ou pulmonaire par des pathogènes, en raison de la compétition entre micro-organismes pour survivre dans un milieu donné.

2.5.3. Microbiotes et résistance à la colonisation

Les interactions entre bactéries, champignons et virus sont multiples et diverses. Ces interactions peuvent être directes par compétition pour les nutriments ou par toxicité (production de bactériocines, système de sécrétion de type VI, infections par des bactériophages, ...) ou indirectes par induction immunitaire (stimulation de la production de défensines, RegIII γ) ou production de métabolites comme les acides gras à chaîne courte ou des sels biliaires (249). Certaines compositions du microbiote semblent ainsi protéger de la colonisation et de l'infection par des pathogènes. A l'inverse, la perturbation du microbiote peut également promouvoir ces infections (250–252).

En réanimation, il a été montré une modification profonde du microbiote pulmonaire au cours de la ventilation mécanique avec, chez certains patients, une colonisation des poumons par le microbiote digestif. Cette colonisation est facilitée par la contamination par les soignants lors des soins, la perte de diversité du microbiote digestif avec l'expansion de quelques espèces, la perte d'acidité gastrique ou encore le transport intra plaquettaire de certaines bactéries. Quelques qu'en soient les mécanismes, la profondeur de la modification du microbiote pulmonaire au cours de la ventilation mécanique a été identifiée comme un marqueur prédictif de la survenue de PAVM (253,254). Ces données d'association sont renforcées par les données d'un modèle murin prouvant une causalité entre les modifications des microbiotes pulmonaires mais aussi digestifs et la résistance aux infections pulmonaires bactériennes (255–258). Ainsi, la surveillance de la composition du microbiote pulmonaire pourrait, peut-être un jour, permettre une identification précoce des patients à risque de PAVM (259,260).

Certains auteurs proposent également des stratégies de modulation du microbiote pour prévenir la survenue des PAVM. Les modalités de modulation du microbiote seront discutées dans la partie 2.6. Succinctement, la décolonisation digestive sélective (DDS) diminue probablement la survenue de PAVM mais ne semble pas avoir d'impact sur la mortalité en réanimation (261). De plus, des résistances aux antibiotiques utilisés pour la DDS émergent (262,263). Une autre approche est de donner des probiotiques pour « contrer » les modifications du microbiote. Les résultats des différentes études sont extrêmement hétérogènes probablement en raison du fait du choix souvent aléatoire des microorganismes donnés comme probiotiques (264,265).

En plus de la résistance à la colonisation à des pathogènes, les modulations du microbiote pourraient avoir un rôle dans la colonisation et l'infection à des germes résistant aux antibiotiques comme les E-BLSE. Cela n'a pas encore été étudié en réanimation malgré le grand nombre de patients colonisés à E-BLSE mais certaines données émergent actuellement dans la littérature.

En effet, les microbiotes intestinaux de patients hospitalisés porteurs de bactéries multi-résistantes ont été comparés à ceux de patients non porteurs de bactéries multi résistantes. Les microbiotes de patients porteurs avaient une composition différente de celle des patients non-porteurs. Les *Lactobacillus spp.* semblent être protecteurs de cette colonisation (266). Néanmoins, les bactéries multi-résistantes étaient aussi bien des bacilles à Gram négatif que des cocci à Gram positif et il ne semble pas forcément judicieux de les analyser ensemble. Concernant les E-BLSE, une étude thaïlandaise étudiant les microbiotes de personnes dans la communauté porteuses vs non-porteuses d'E-BLSE n'a pas retrouvé de différence de diversité alpha mais a montré que les bactéries du phylum *Bacteroidetes*, en particulier l'espèce *Bacteroides uniformis* était plus abondante chez les non-porteurs d'E-BLSE que chez les porteurs (267). Peu de données sont actuellement disponibles sur le sujet mais l'impact du microbiote sur la portage d'E-BLSE et les moyens de modulation de ce microbiote devrait être un sujet d'intérêt dans les années à venir.

2.6. Modulation du microbiote

Comme abordé succinctement précédemment, il existe plusieurs approches pour tenter de moduler le microbiote. Les plus explorées sont celles de l'administration d'une antibiothérapie ou de probiotiques « à l'aveugle ». De nouvelles approches plus ciblées et plus personnalisées pourraient émerger.

2.6.1. Antibiothérapie

L'administration systématique d'antibiotique aux porteurs digestifs d'E-BLSE afin d'éradiquer le portage a été proposé. Cette DDS se fait principalement avec des traitements basés sur la colimycine, la tobramycine et la chlorhexidine, le plus souvent en association. L'intérêt de la DDS dans cette indications d'éradication du portage digestif des E-BLSE est également débattu car l'effet semble très modeste et peu stable dans le temps. L'absence de données robustes a amené la société européenne « European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease » à ne pas se prononcer sur la DDS dans cette indication (268). De plus, la DDS semble s'accompagner de l'émergence de résistance aux antibiotiques utilisés. Les données sur ce sujet ont également été développées dans la revue systématique publiée dans *Critical care* (en Annexe n°2 pages 162-174). Un débat existe également sur le fondement même de l'approche visant à résoudre un problème lié à l'utilisation des antibiotiques par l'utilisation d'autres antibiotiques.

2.6.2. Transplantation fécale

La première preuve de concept de l'utilisation de la transplantation fécale pour l'éradication d'un pathogène a été publiée dans le cadre du traitement de la colite à *Clostridium difficile*, cadre dans laquelle son efficacité est associée à une augmentation de la diversité alpha (269). Concernant l'éradication de bactéries résistantes aux antibiotiques, quelques cas sont rapportés dans la littérature, essentiellement pour des colonisations digestives à entérocoque résistant à la vancomycine (ERV), des *Acinetobacter baumannii* ou des E-BLSE (270,271). Un premier essai contrôlé randomisé, publié récemment, est négatif mais a été stoppé avant son terme (272). De nouvelles études sont en cours, en particulier un Programme Hospitalier de Recherche Clinique national lauréat de l'appel d'offres 2018 (PHRCN-18-0161FECES) mené par Victoire de Lastours (Hôpital Beaujon, AP-HP). Cependant, la transplantation fécale reste une approche récente pour laquelle il y a peu de recul. Un décès récent dans une étude aux Etats-Unis en

raison du transfert d'une bactérie résistante aux antibiotiques a rappelé la nécessité d'une sélection rigoureuse des donneurs (273). De plus, il existe un pan entier du microbiote (bactériophages, autres virus, prions, métabolites, ...) non connu transféré à l'aveugle au patient sans connaissance des conséquences potentielles à moyen et long termes. Par ailleurs, les patients de réanimation ont fréquemment une perméabilité digestive augmentée, ce qui augmente le risque de translocation des microorganismes transférés et donc potentiellement le risque d'infections ou d'inflammation à distance chez ces patients fragiles (274). Enfin, les procédures de recueil sanitaire et de conservation rendent la transplantation coûteuse, en ces temps de tension budgétaire. Des approches alternatives sont donc recherchées pour parvenir au moins à la même efficacité en limitant les effets indésirables et les coûts.

2.6.3. Autres approches

Une première approche serait de réaliser des « auto-greffes » fécales. Une entreprise de biotechnologie française, MaaT Pharma (du nom de la déesse égyptienne de la justice et de l'équilibre divin) propose de restaurer la composition initiale du microbiote par greffe de son propre microbiote préalablement congelé (conservation par précaution ou ou avant le début d'un traitement). Une étude a récemment démontré que cette approche était efficace pour reconstituer le microbiote digestif de patients ayant reçu une allo-greffe de moelle osseuse (275). Si cette approche apporte une certaine sécurité par rapport à « l'allo-greffe » fécale, elle ne résout pas les problèmes de coût. De plus, le microbiote évoluant avec l'âge et la physiologie de l'hôte, il n'est pas certain que le microbiote pré-maladie à un âge donné soit celui adapté à l'hôte après la maladie avec quelques années de plus.

Une seconde approche serait de donner des probiotiques. Comme discuté précédemment pour la prévention des PAVM, les résultats des études sont très discordants car chaque équipe choisit le ou les micro-organisme(s) qu'elle souhaite. Les résultats de ces études sont donc difficilement comparables. Une étude récente a même montré que l'administration de probiotiques de façon standardisée pouvait retarder plutôt qu'aider la reconstitution du microbiote après une antibiothérapie (276). Cette étude met bien en exergue le fait qu'il n'existe pas de microbiote « normal » et que le microbiote cible dépend probablement et de l'indication voire de l'étape d'évolution de la maladie, et de chaque individu. Une première étape dans le ciselage des probiotiques en fonction de l'objectif et de l'indication a été franchie par l'équipe américaine d'Eric Pamer. En comparant les microbiotes d'un modèle murin de colonisation à

ERV avant et après traitement par ampicilline, un consortium de quatre bactéries commensales capable de restaurer une résistance à la colonisation digestive par l'ERV a été identifié. De façon intéressante, une des bactéries identifiées, *Clostridium boltea* n'a aucune action directe sur l'ERV mais permet la colonisation digestive par *Blautia producta* qui, elle, produit une bactériocine active contre ERV (277). La majorité de ces études se sont centrées sur les bactéries mais il ne faut pas oublier les champignons qui sont capables d'interaction avec les bactéries et ont, par eux-mêmes, des interactions multiples avec l'hôte mimant un certain nombre de propriétés du microbiote bactérien (278,279). Ils pourraient donc également avoir un rôle dans la prédisposition ou, *a contrario*, la résistance à la colonisation par des pathogènes ou des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Enfin, le fait que le surnageant d'un prélèvement de selles ou de culture bactérienne puisse avoir des effets similaires à une transplantation fécale classique (280–282) incite à en étudier ses composantes. Ce surnageant contient en premier lieu des bactériophages, plus grands régulateurs de biomasse sur terre. Ces virus infectant les bactéries ont été découverts au 19^{ème} siècle par Félix d'Hérelle et ont connu un essor en thérapeutique humaine jusqu'à la découverte de la pénicilline. Ils ont continué à être utilisés dans la prévention et le traitement des infections bactériennes en Europe de l'Est communiste (en particulier en Géorgie) avec une efficacité empirique mais sans avoir prouvé leur efficacité dans des essais de méthodologie robuste. Des cas rapportés ainsi que le traitement d'infections dans des modèles murins rendent cette approche prometteuse et plusieurs essais cliniques sont en cours (283–286). Si les résultats de cette voie prometteuse sont encourageants, il faut néanmoins rester prudents car les bactériophages n'agissent pas seulement par lyse directe mais aussi par stimulation du système immunitaire de l'hôte (287). De plus, le dogme comme quoi les bactériophages n'infectent que les bactéries est probablement partiellement faux. En tout cas, il a été montré qu'ils ont au moins une capacité de transcytose des cellules épithéliales humaines mais uniquement dans le sens apical vers basal (288). Enfin les bactériophages lysogéniques et non lytiques ont une capacité de dissémination des gènes de résistance (289,290).

Le surnageant ne contient pas que les bactériophages mais également des protéines et des métabolites produits par les microorganismes présents au sein du microbiote. La bactériocine produite par *B. producta* active contre ERV, peut se retrouver dans le surnageant. En se focalisant sur les Entérobactéries, le surnageant de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LDD01, inhibe la croissance de *K. pneumoniae* en présence d' α -amylase et de NaOH 1N mais plus après traitement à la protéinase K suggérant la production de bactériocine (291). Il en va de même

pour les surnageants de *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium* et *Lactobacillus plantarum* mais pas de *Bacteroides fragilis* ni de *Bifidobacterium longum*. La surnageant de la culture de *C. butyricum* MIYAIRI 58 supprime même la transcription du gène *bla_{CTX-M-15}* pendant la phase de croissance d'*E.coli* et diminue les capacités de transmission du gène de résistance dans des expériences de conjugaison (292). Ces effets sont possiblement dus à des bactériocines mais pourrait également être la conséquence de métabolites. En effet, le microbiote naïf d'antibiotique limite la croissance d'isolats cliniques de *K. pneumoniae*, *E. coli* ou encore *Proteus mirabilis* en acidifiant la lumière colique et en perturbant le pH intracellulaire de ces bactéries via des acides gras à chaîne courte (293). Ces métabolites, et en particulier les acides gras à chaîne courte, sont également les composés médiant un certain nombre de stimulations immunitaires ou métaboliques de l'hôte et donc pourraient être, à ce titre, doublement intéressants.

Tous ces exemples prouvent qu'il existe de multiples façons de moduler le microbiote en dehors de la transplantation fécale avec chacune ses avantages et ses inconvénients. La compréhension des modifications du microbiote associées à une pathologie est une première étape afin de disséquer ces mécanismes.

Objectifs de la thèse

Tout d'abord, nous avons souhaité étudier la **dissémination clonale** des E-BLSE.

Nous nous sommes d'abord concentrés sur la dissémination clonale inter-patients. En effet, les données disponibles dans la littérature amènent à poser l'hypothèse que l'acquisition d'une colonisation digestive par E-BLSE n'est pas majoritairement liée à une transmission clonale. Pour répondre à cet objectif, nous avons étudié la clonalité des souches isolées lors du dépistage de la colonisation digestive à E-BLSE en réanimation par pulsed-field gel electrophoresis.

Nous avons ensuite étudié la dissémination clonale « intra-patients » à savoir le lien entre colonisation et infection par une E-BLSE. En effet, le fait d'être colonisé au niveau digestif par une E-BLSE pourrait être un facteur de risque d'infection par E-BLSE. Nous avons alors étudié la clonalité entre la souche colonisante et celle infectante également par PFGE.

Ensuite, nous avons étudié la **dissémination plasmidique**. En effet, les capacités d'échange des plasmides supports des gènes codant pour les BLSE suggèrent que cette dissémination plasmidique pourrait participer à la dissémination des E-BLSE. La deuxième hypothèse est que cette acquisition pourrait, en partie, être liée à une dissémination plasmidique entre entérobactéries. Pour cela, un typage des groupes d'incompatibilité plasmidique par PCR après conjugaison ou transformation a été réalisé.

Enfin, nous avons voulu étudier le **rôle de l'environnement** dans l'acquisition et l'expansion d'une E-BLSE par un patient. L'environnement dans lequel se trouve cette E-BLSE au niveau du tube digestif est constitué par le microbiote intestinal. L'hypothèse est que les modifications du microbiote induites par la fragilité de l'hôte et les différents traitements reçus, *a fortiori* en réanimation, pourraient favoriser l'implantation et/ou l'émergence d'un clone d'E-BLSE au niveau digestif.

Dans un premier temps, nous avons comparé les microbiotes associés ou non à un portage d'E-BLSE. Un suivi longitudinal d'une grande population pour faire une étude avant-après étant coûteuse et difficile à réaliser sur le plan pratique, nous avons donc comparé les microbiotes et mycobiotés de patients colonisés par une E-BLSE au niveau digestif à leur admission en réanimation à ceux de patients non colonisés.

Dans un second temps, nous avons comparé les microbiotes associés au lien colonisation-infection en comparant les microbiotes des patients colonisés à E-BLSE ayant développé une infection à E-BLSE à ceux des patients colonisés à E-BLSE n'ayant pas eu d'infection à E-BLSE.

Matériels et Méthodes

1) Dépistage des E-BLSE en réanimation

1.1. Inclusion des patients et définitions

Nous avons mené une étude observationnelle, prospective et monocentrique sur une période de six mois, entre le 1er janvier 2015 et le 30 juin 2015. Le service de réanimation médicale du GH Pellegrin au CHU de Bordeaux est composé de 37 lits (25 lits répartis sur 2 ailes de réanimation lourde et 12 lits de post-réanimation sur une 3^{ème} aile) avec 1200 patients admis par an pour une durée moyenne d'hospitalisation de 5 jours.

Dans notre étude, un transfert d'une aile à une autre (en général vers l'unité de soins continus) était considéré comme un seul et même séjour. Les dépistages étaient effectués de façon systématique, par écouvillonnage rectal, chez tous les patients admis dans le service de réanimation, à l'admission et de façon hebdomadaire pendant toute la durée du séjour. Le prélèvement était réalisé à l'aide d'un Transport Swab VWR de Copan®. Un patient dont le dépistage rectal revenait positif était considéré porteur de E-BLSE durant la totalité de son séjour, mais continuait à participer aux dépistages. La détection d'une souche de portage E-BLSE d'importation a été définie comme un premier dépistage positif dans un délai de 48 heures après l'admission dans le service. *A contrario*, l'acquisition d'une souche de portage E-BLSE au cours du séjour a été définie comme un premier dépistage positif dans un délai strictement supérieur à 48 heures après l'admission alors que les précédents étaient négatifs.

Nous avons considéré comme « redondantes » les souches de même espèce bactérienne retrouvées en portage digestif chez un même patient sur deux ou plusieurs dépistages consécutifs durant la même hospitalisation. Dans ce cas, une seule souche E-BLSE a été prise en compte, la première détectée, et les souches isolées à partir des autres dépistages positifs n'ont pas été analysées. En revanche, pour les patients connus porteurs de E-BLSE lors d'une hospitalisation précédente, nous avons conservé la souche du dépistage positif réalisé lors de la nouvelle admission, même si l'espèce bactérienne était identique à celle du dépistage antérieur. De plus, si un même dépistage était positif avec deux E-BLSE différentes, chacune des souches disponibles a été analysée.

1.2. Procédures de dépistage

Les prélèvements rectaux effectués dans le service de réanimation ont été acheminés à température ambiante vers le laboratoire de bactériologie du GH Pellegrin. L'écouvillon rectal a été déchargé sur un milieu de culture de type chromID ESBL® (bioMérieux® référence 43481), qui a ensuite été ensemencé manuellement en cadran à l'aide d'un ensemenceur. La gélose chromID ESBL® est un milieu chromogène sélectif commercial contenant un mélange d'antibiotiques, dont le cefpodoxime (C3G), et de substrats non colorés. Ces substrats sont assimilés par les bactéries et ils donnent une substance colorée (métabolite) si la bactérie produit certaines enzymes caractéristiques d'espèce ou de genre. Après incubation de la gélose dans une étuve à 37°C pendant 16 à 24 h dans des conditions aérobies, cela conduit à la production de colonies bactériennes colorées, visibles à l'œil nu. Ce milieu permet d'obtenir simultanément une orientation d'espèce et de résistance, et il est ainsi utilisé pour dépister les E-BLSE.

Toutes les colonies colorées ayant poussé sur le milieu ont été suspectées de produire une BLSE. La lecture des cultures s'est effectuée comme suit, selon les recommandations du fabricant : une coloration spontanée rose à bordeaux (souches productrices de β -glucuronidase) évoquait une souche de l'espèce *E. coli*, une coloration spontanée vert/bleu à brun-vert (souches exprimant une β -glucosidase) orientait vers une souche du genre *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* et une coloration spontanée brune à marron (souches exprimant une désaminase) évoquait une souche du genre *Proteus*, *Providencia* et *Morganella*. Un test à l'oxydase a permis d'éliminer les souches du genre *Pseudomonas* (oxydase positive) qui prennent une coloration brune sur ce milieu. Les souches d'*A. baumannii* ont également pu être détectées sur ce milieu, sous la forme de colonies muqueuses blanches ou crème et oxydase négative. Toutes les colonies colorées ayant poussé sur le milieu chromID ESBL® (à l'exception des colonies dont la recherche de l'oxydase était positive) ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

1.3. Identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le laboratoire de bactériologie du GH Pellegrin dispose d'un appareil MALDI Biotyper de type Microflex® de marque BRUCKER® utilisé en routine et permettant une identification précise, rapide, et fiable des bactéries. Il s'agit d'un spectromètre de masse utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) et d'un analyseur de temps de vol (TOF = Time Of Flight). C'est une technique qui permet de séparer des biomolécules de grande taille sans les dégrader.

Chaque échantillon analysé correspondait à une fraction de colonie bactérienne, prélevée directement à partir d'une culture de 18 à 24h et déposée au sein d'un disque de 3 mm de diamètre sur une plaque en métal inerte. La matrice ionisante a ensuite été ajoutée à l'échantillon, et le mélange matrice-échantillon cristallisé (après un temps de séchage) a formé un dépôt solide appelé cible. Ensuite, la plaque a été introduite dans l'appareil et la cible a été ciblée par le laser (Figure 8). L'énergie du laser a deux effets : (i) la matrice s'est vaporisée entraînant la désorption des particules ionisables du mélange matrice-échantillon, et (ii) un transfert de protons s'est fait entre les molécules de la matrice et celles de l'échantillon qui se sont ionisées. Les ions produits ont été accélérés grâce à l'application d'un champ électrique dans un tube de vol sous vide jusqu'à un détecteur permettant de mesurer le temps mis pour l'atteindre, appelé temps de vol. Le temps de vol d'une particule est proportionnel à sa masse et à sa charge permettant d'obtenir un spectre des particules présentes (Figure 9). Les fichiers des spectres ont été lus par le logiciel FlexAnalysis® associé à l'appareil, et un algorithme statistique a permis de comparer le spectre obtenu à ceux définis dans une base de données. Ceci a permis l'identification du micro-organisme analysé, selon un score de confiance estimant la fiabilité de l'identification au genre et à l'espèce bactérienne. Après identification de l'espèce bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF, les souches appartenant à la famille des entérobactéries ont fait l'objet d'une recherche complémentaire afin de détecter une activité BLSE.

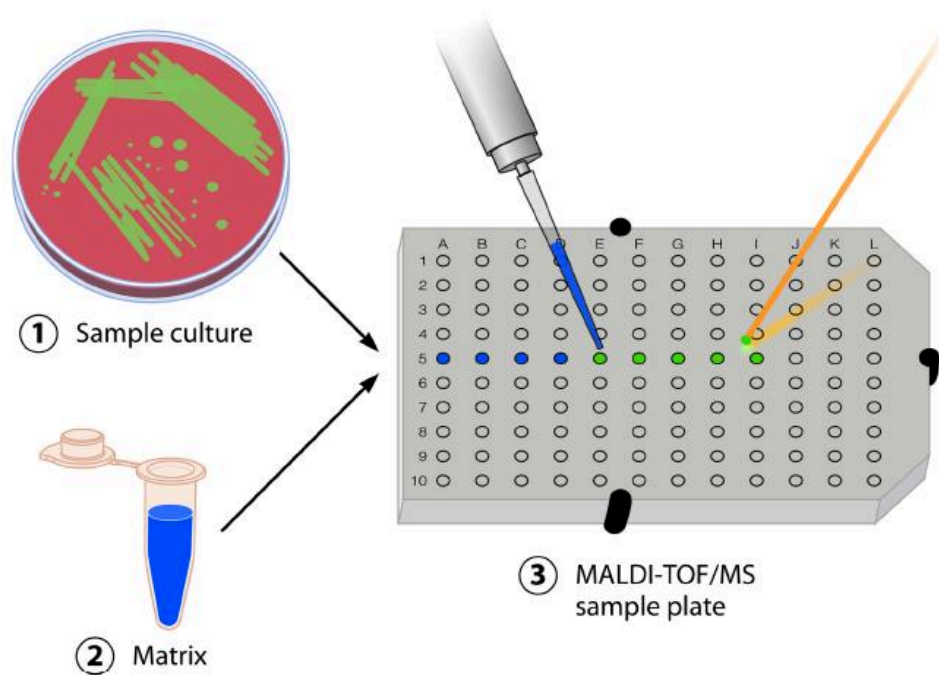


Figure 8 : Méthode pour l'identification des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF à partir d'une culture bactérienne (Clark *et al.*, 2013 (294)).

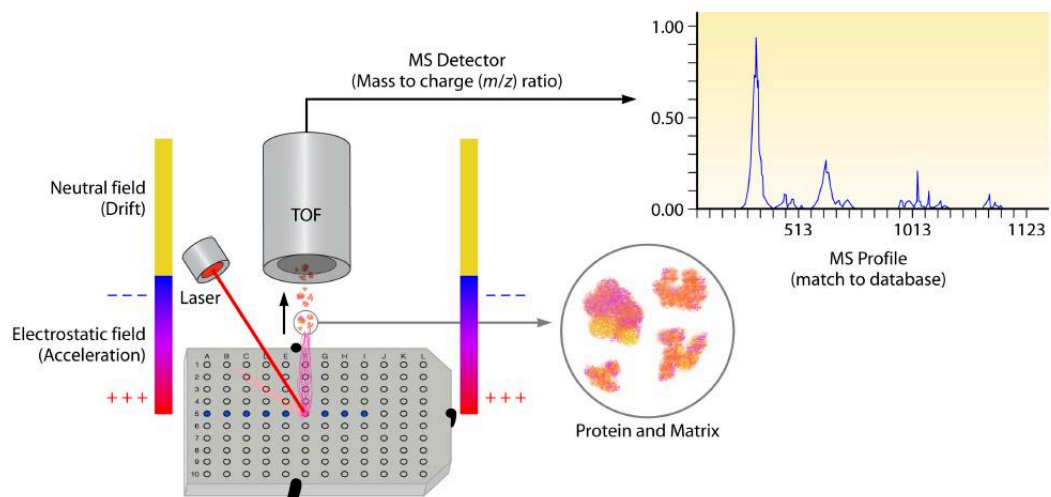


Figure 9 : Schéma général du fonctionnement du spectromètre de masse MALDI-TOF (Clark *et al.*, 2013).

1.4. Détection de l'activité BLSE par le test MAST® AMPC & ESBL DETECTION DISCS

Pour chaque colonie colorée oxydase négative ayant poussé sur le milieu de culture chromID ESBL® et ayant été identifiée comme une entérobactérie par spectrométrie de masse MALDI-TOF, une recherche complémentaire de la production de BLSE a été réalisée à l'aide du test MAST® AMPC & ESBL DETECTION DISCS D68C. Ce test est indiqué pour la distinction de la production d'enzymes de type céphalosporinase AmpC ou BLSE. Il est composé de 4 disques : disque A = Cefpodoxime 10 µg, disque B = Cefpodoxime 10 µg + acide clavulanique, disque C = Cefpodoxime 10 µg + cloxacilline, disque D = Cefpodoxime 10 µg + acide clavulanique et cloxacilline. Pour chaque souche suspecte, une suspension bactérienne a été préparée dans une solution saline physiologique à partir d'une culture pure de 18 à 24h. Cette suspension a été répartie uniformément à la surface d'une gélose de type Mueller Hinton (MH). Les 4 disques ont alors été placés sur la géloseensemencée, en assurant un espace suffisant entre chaque disque pour obtenir des zones d'inhibition bien définies. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 h dans des conditions aérobies, les diamètres des zones d'inhibition ont été comparés selon les instructions du fabricant, permettant de détecter la production d'une BLSE et/ou l'hyperproduction d'une céphalosporinase plasmidique ou chromosomique. Ensuite, les souches E-BLSE ont été conservées dans des tubes de milieu de conservation : MH avec 10 % de glycérol et stockées à -80°C dans un congélateur du laboratoire de l'université.

2) Caractérisation des gènes de résistance des isolats E-BLSE

2.1. Antibiogramme en milieu gélosé par diffusion

Au laboratoire de bactériologie du GH Pellegrin, l'antibiogramme n'est pas réalisé en routine pour les souches E-BLSE de portage digestif. Les souches E-BLSE de cette étude ont donc été ré-isolées sur gélose MH et incubées pendant 18 à 24h à 37°C en atmosphère aérobie. Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé, conformément aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie et de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (295). La sensibilité des souches E-BLSE a été étudiée au moyen de la grille standard du laboratoire de bactériologie du GH Pellegrin qui contient 28 disques antibiotiques répartis de la façon suivante (Figure 10) :

- 1) 1ère boîte MH « β -lactamines » 16 disques antibiotiques : ampicilline, amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, pipéracilline + tazobactam, céfalotine, céfixime, céfuroxime, céfoxitine, ceftriaxone, ceftazidime, céfépime, aztréonam, méropénème, ertapénème et imipénème.
- 2) 2e boîte MH « divers » 12 disques antibiotiques : gentamicine, tobramycine, amikacine, colistine, acide nalidixique, norfloxacine, ciprofloxacine, nitrofurantoïne, cotrimoxazole, doxycycline, tigécycline et fosfomycine.



Figure 10 : Antibiogramme des entérobactéries selon les recommandations EUCAST. A noter, la présence d'une image de bouchon de champagne en faveur d'un phénotype BLSE. De plus, les disques antibiotiques de mécillinaam et témocilline, non contenus dans la grille standard du laboratoire, ont été testés en parallèle sur gélose MH, portant à 30 le nombre d'antibiotiques testés avec cette méthode.

2.2. Détermination des CMI par méthode E-test

La détermination de la CMI par bandelette antibiotique E-test est également une méthode de diffusion en milieu gélosé MH à 37°C. C'est une méthode de référence au laboratoire de bactériologie pour mesurer la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique donné. Le principe repose sur l'utilisation d'une bandelette au verso de laquelle des inserts de concentration croissante de l'antibiotique étudié ont été déposés. Quand la bandelette est déposée sur une gélose MH préalablement ensemencée avec la bactérie à tester, il se crée un gradient continu d'antibiotique croissant du bas vers le haut de la bandelette. Après incubation de 18 à 24h à 37°C, une zone d'inhibition en forme d'ellipse apparaît permettant la lecture de la CMI à l'intersection basse de la culture avec la bandelette (Figure 11).

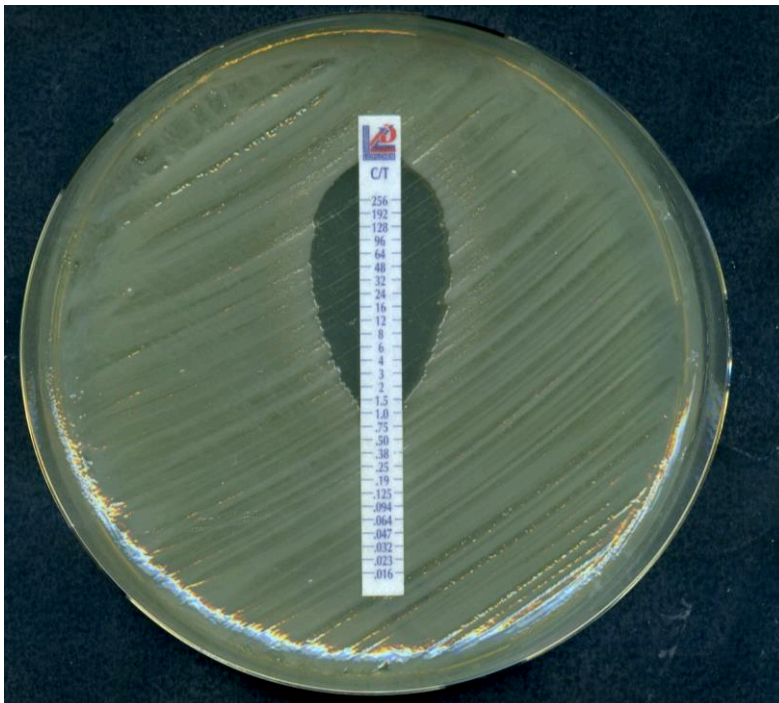


Figure 11 : Détermination de la CMI au ceftolozane-tazobactam par bandelette E-test

Nous avons réalisé des CMI par méthode E-test sur les souches E-BLSE de portage disponibles pour les 5 antibiotiques suivants : pipéracilline-tazobactam (i2a®), ceftazidime, céfépime, témocilline et ceftolozane-tazobactam (bioMérieux®). Après 18 à 24 h d'incubation en aérobiose, les CMI ont été lues comme décrit plus haut et interprétées selon les concentrations critiques définies pour les entérobactéries dans l'édition 2016 de l'EUCAST (295).

2.3. Identification moléculaire des gènes codant les β -lactamases à spectre élargi

2.3.1. Extraction d'ADN génomique par technique dite « SET »

L'extraction d'ADN génomique à partir des cultures bactériennes a été réalisée par une technique « maison » dite « SET ». Les souches E-BLSE de portage disponibles ont été ré-isolées sur gélose MH et incubées pendant 18 à 24h à 37°C en atmosphère aérobie. Les bactéries ainsi obtenues ont été mises en suspension dans 500 μ L de tampon « SET » (NaCl à 75 mM ; EDTA à 25 mM ; Tris pH=7,5 à 20 mM) auxquels ont été ajoutés 50 μ L de sodium dodecyl sulfate (SDS) à 10 % et 5 μ L de lysozyme à 20 mg/mL. Après une heure au bain marie à 37°C, 220 μ L de NaCl à 5 M ont été ajoutés pour arrêter la réaction de lyse. Par la suite, 700 μ L de chloroforme isoamylalcool ont été ajoutés. Le mélange ainsi formé a été vortexé afin de séparer les protéines des acides nucléiques. Une centrifugation de 10 minutes à 10 000 g a permis de récupérer l'ADN en solution dans la phase aqueuse supérieure dans un tube eppendorf propre. Sept cent microlitres d'isopropanol froid y ont été ajoutés et le mélange a été placé au moins une heure au congélateur à - 20°C dans le but de précipiter l'ADN (apparition d'une pelote blanche). Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000 g, l'isopropanol a été retiré et le culot a été lavé avec 800 μ L d'éthanol à 70°. Après une dernière centrifugation de 5 minutes à 10 000 g, le surnageant a été retiré et le culot a été laissé à température ambiante jusqu'à évaporation totale de l'éthanol. Enfin le culot a été repris dans 50 μ L d'eau distillée stérile.

Pour chaque extrait, la concentration en ADN, ainsi que le taux de contamination par divers constituants, ont été calculés, à partir de la mesure de l'absorbance effectuée sur 2 μ L d'échantillon, à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® 2000 de marque Thermo Scientific®. La concentration en ADN double brin a été calculée sur la base de l'absorbance à 260 nm, et du coefficient d'extinction défini pour l'ADN double brin soit 50 ng/ μ L. En fonction des concentrations en ADN obtenues, chaque échantillon a ensuite été dilué avec de l'eau distillée stérile, afin d'obtenir une concentration finale en ADN homogène pour tous les échantillons avoisinant 50 ng pour 10 μ L d'échantillon ; 10 μ L étant le volume d'extrait d'ADN utilisé pour chaque réaction de PCR (décrite ci-après). Le taux de contamination des extraits d'ADN a été calculé par deux rapports d'absorbance. Le rapport de l'absorbance à 260 et 280 nm (260/280) est utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN. Un rapport aux alentours de 1,8 est généralement accepté comme un ADN « pur ». Si le rapport est nettement plus faible, il peut indiquer la présence de protéines ou d'autres contaminants qui absorbent à 280 nm. Le rapport de l'absorbance à 260 et 230 nm (260/230) est utilisé en complément. Les valeurs de ce rapport

sont souvent plus élevées que celles du rapport 260/280 et sont généralement attendues dans la gamme allant de 2,0 à 2,2. Si le rapport est plus faible, cela peut indiquer la présence de contaminants qui absorbent à 230 nm (EDTA, polysaccharide, polyphénol).

2.3.2. Réaction d'amplification par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR, est une technique qui permet d'amplifier *in vitro* de façon exponentielle une région d'ADN, dans le but d'en obtenir une quantité suffisante pour pouvoir l'analyser ultérieurement. La PCR multiplex permet d'amplifier plus d'un amplicon à la fois par utilisation de plusieurs couples d'amorces au cours d'une même réaction.

La réaction d'amplification par PCR utilisée pour la caractérisation des gènes codant pour les BLSE était une technique « maison ». Deux PCR multiplex ont été réalisées pour chaque souche : (i) la première (PCR multiplex TSO) utilisant des amorces universelles pour la détection des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* et *bla_{OXA-1-like}* et entraînant la production d'amplicons de 800, 713 et 562 paires de bases (pb) respectivement ; (ii) l'autre (PCR multiplex CTX-M) utilisant des amorces universelles pour la détection des gènes *bla_{CTX-M} groupe 1*, *bla_{CTX-M} groupe 2* et *bla_{CTX-M} groupe 9* et entraînant la production d'amplicons de 688, 404 et 561 pb respectivement. Enfin, une troisième PCR en point final dite « 16S » a été réalisée en parallèle comme témoin d'extraction. Elle a, en effet, permis de détecter de l'ADN bactérien à l'aide d'amorces ciblant un gène très conservé, le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.

L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant l'enzyme GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega®). Le mélange réactionnel a été réalisé en utilisant du tampon 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega®), du MgCl₂ à 25 mM, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) à 200 µM, des amorces spécifiques à 10 µM, de l'ADN à amplifier, et complété avec de l'eau milli-Q nuclease-free pour avoir un volume final de 50 µL. Pour chaque réaction d'amplification par PCR, il a été utilisé un témoin négatif (de l'eau milli-Q nuclease-free) et des témoins positifs. Chaque témoin positif était constitué d'ADN extrait chez des bactéries précédemment identifiées comme porteuses des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1-like}*, *bla_{CTX-M} groupe 1*, *bla_{CTX-M} groupe 2* et *bla_{CTX-M} groupe 9*.

La réaction d'amplification a été réalisée sur un thermocycleur MyIQ® ou MyCycler® de marque BIO-RAD® dans les conditions suivantes : 1) première dénaturation à 95°C pendant 4 min, 2) amplification génique : 30 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant

40 secondes, d'une étape d'hybridation à 60°C pendant 40 secondes et d'une étape d'élongation à 72°C pendant une minute, 3) enfin, une étape finale à 72°C pendant 7 min

L'électrophorèse a pour but de séparer, selon leur taille, les acides nucléiques chargés négativement, au travers d'un gel d'agarose, sous l'effet d'un champ électrique. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 %. L'électrophorèse a été réalisée en tampon TAE 1X (solution pH 8,0 ; 40 mM de TrisHCl, 20 mM d'acide acétique, 1 mM d'EDTA), sous une tension d'environ 3V/cm (100V) à l'aide d'un appareil Mupid®-One de marque Eurogentec®. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans les puits du gel situés de part et d'autre des produits de PCR, afin de pouvoir évaluer la taille des amplicons.

La migration a été suivie visuellement grâce au tampon de la polymérase (5X Green Go Taq® Flexi Buffer) qui contient un colorant bleu migrant à la même vitesse que des fragments d'ADN de 3-5 kb, et un colorant jaune migrant plus vite que les amorces (< 50 pb) dans un gel d'agarose à 1 %. Après la migration, le gel a été immergé pendant 5 à 10 minutes dans un bain de Bromure d'Ethidium (BET), qui est un agent intercalant de l'ADN visualisé sous ultraviolets. Après immersion, le gel a été placé dans l'appareil Gel Doc® de marque BIO-RAD® qui permet l'exposition du gel aux ultraviolets, révélant ainsi les produits d'amplification sous forme de bandes d'ADN fluorescentes (Figure 12). La photographie, puis l'acquisition de l'image ont été réalisées à l'aide du logiciel Quantity One®.

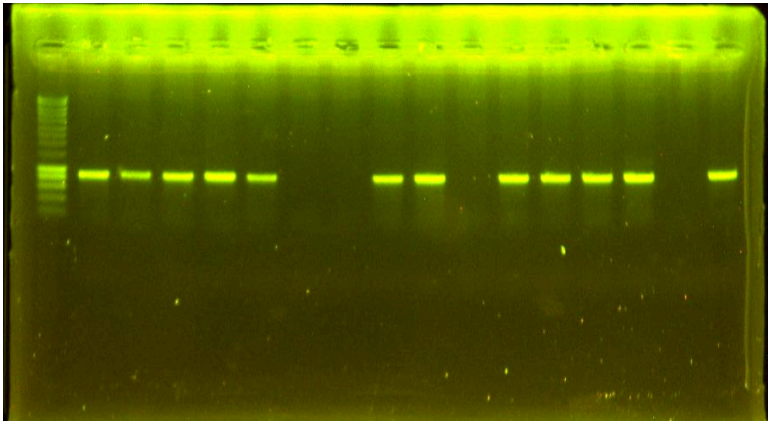


Figure 12 : Gel de migration révélant les amplicons obtenus à partir des amorces TEM.

2.3.3. Séquençage des gènes codant les BLSE

Les amplicons obtenus par PCR étaient envoyés pour séquençage Sanger par la société Eurofins genomics à l'aide du Mix2Seq Kit. L'alignement des séquences ainsi que leur lecture étaient réalisés à l'aide du logiciel BioEdit 7.2.

3) Etude de la dissémination clonale par électrophorèse en champ pulsé

Dans un premier temps, les souches E-BLSE sont isolées sur gélose MH avec une incubation de 24h à 37°C en conditions aérobies. Après croissance des souches, une culture de 4-5 heures sous agitation dans les mêmes conditions dans 3 mL de milieu MH liquide est réalisée.

Les cultures bactériennes ainsi obtenues sont centrifugées puis suspendues 150µl de Cell Suspension Buffer froid. Sont ensuite ajoutés 6 µl de lysozyme à 100mg/ml puis 150µl d'Agarose 1% obtenu dans un milieu Tris-Borate-EDTA. L'ensemble est coulé dans le moule à inserts afin d'obtenir les inserts qui seront ultérieurement intégrés au gel de migration.

Une fois solidifiés, ces inserts sont plongés dans 500µl de Lysis Buffer 1X et 20µl de lysozyme à 100mg/mL puis incubés 1heure à 1heure 30 à 37 °C en conditions aérobies sans agitation. Les inserts sont ensuite rincés avec 1 ml de Wash Buffer 1X. Après rinçage, 400 µl de tampon de la protéinase K et 100 µl de protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés pour incubation 16 à 20h à 50°C sans agitation. Les inserts sont de nouveau rincés avec 1 ml de Wash Buffer 1X pendant 30 à 60 minutes à température ambiante sur agitateur rotatif, cette étape étant répétée 3 fois de suite.

Après le troisième lavage, les mêmes lavages avec 1 ml de Wash Buffer 0,1X sont réalisés afin de se rapprocher progressivement de la force ionique du tampon de l'enzyme de restriction.

Les inserts sont ensuite immergés dans 500 µL du tampon Multicore® de l'enzyme de restriction pendant 30 à 60 minutes à température ambiante, tampon renouvelé pour un volume de 300 µL auxquels sont ajoutés 5 µL (30 à 50U) de l'enzyme de restriction. L'enzyme de restriction est laissée active pendant 16 à 20 heures à 37°C. Les inserts sont de nouveau rincés avec 1 ml de Wash Buffer 1X. Les inserts sont alors prêts à être incorporés dans un gel d'agarose 1% en Tris-Borate-EDTA pour migration.

Une fois l'assemblage solidifié, le gel est baigné dans le même tampon Tris-Borate-EDTA 1X maintenu à 14°C dans la cuve de migration. Pour les entérobactéries, les paramètres de migration sont un « Initial switch » de 10 secondes et un « Final switch » de 40 secondes, un angle de 120°, un temps de migration de 19,5 heures et une tension électrique de 6 volts/cm. L'intensité du courant doit être comprise entre 220 et 260 mA.

La révélation du gel se fait par bromure d'éthidium selon le même principe que celui présenté précédemment pour les gels de PCR, le temps de bain étant simplement plus long. Le logiciel acquisition d'image utilisé était Gel Smart.

4) Etude du lien colonisation-infection

4.1. Identification des patients infectés à E-BLSE

Les logiciels des laboratoires de bactériologie de l'hôpital Pellegrin ainsi que du service d'hygiène hospitalière ont été utilisés pour vérifier que le recueil des patients infectés à E-BLSE était bien exhaustif. Le logiciel de codage des PMSI de l'hôpital Pellegrin a permis d'obtenir tous les séjours avec PAVM ou bactériémie que ce soit à E-BLSE ou à un autre germe pendant la période de l'étude. Le diagnostic de PAVM était confirmé rétrospectivement par deux cliniciens en lecture indépendante selon les recommandations françaises en vigueur (296). Les bactériémies étaient définies par la pousse d'une bactérie sur une hémoculture à l'exception des Staphylocoque à coagulase négative pour lesquels il fallait 3 flacons d'hémoculture positifs pour retenir le diagnostic.

Pour les patients colonisés à E-BLSE, les données démographiques, les antécédents, l'administration d'antibiotiques ou le statut de patient déjà colonisé à E-BLSE au cours de l'année précédente, les hospitalisations ou le caractère « associé aux soins » également dans l'année précédente ainsi que la mortalité à 28 jours et à 1 an ont été recueillis rétrospectivement.

4.2. Statistiques

Les variables quantitatives ont été exprimée en moyenne \pm écart-type ou médiane (intervalle inter-quartile) Les variables qualitatives ont été exprimées en compte (pourcentages). En raison du faible nombre relatif de patients par rapport au études existant sur le sujet et du fait que les données étaient souvent incomplètes pour les patients non colonisés à E-BLSE, nous n'avons pas réalisé de statistique analytique à la recherche de facteur de risque de colonisation à E-BLSE.

4.3. Ethique pour l'étude de la dissémination clonale et plasmidique

Les prélèvements réalisés étant des examens de routine, il n'y avait pas besoin d'autorisation particulière pour leur réalisation. L'exploitation des résultats et des données cliniques étaient faites après anonymisation dans le cadre d'une déclaration de Méthodologie de Référence 3 auprès de la « Commission Nationale Informatique et Libertés » puisque les données provenaient toutes du même service hospitalier.

5) Etude de la dissémination plasmidique par détermination des groupes d'incompatibilité plasmidique

5.1. Extraction plasmidique par technique « Miniscreen »

Les plasmides étaient extraits selon une méthode maison dite « Miniscreen ». En effet, les plasmides portant les gènes codant pour les BLSE sont souvent des plasmides de grande taille (100 à 200kb) parfois difficiles à extraire avec les kits commerciaux. Un bouillon MH de 5mL était ensemencé à 37°C en conditions aérobies avec l'isolat E-BLSE toute la nuit en présence de C3G. La culture était ensuite centrifugée 10 minutes à 9 000 rotation par minute (rpm) et le culot était resuspendu dans 1mL de Tris-Glucose-EDTA puis de nouveau centrifugé selon les mêmes conditions pour enfin être resuspendu dans 100µL de Tris-Glucose-EDTA, l'EDTA permettant de prévenir la dégradation d'ADN et le glucose assurant une osmolarité permettant que les bactéries ne lysent pas avant l'adjonction du tampon de lyse. Deux cents microlitres d'une solution de lyse (200 µL de NaOH 10M, 8,8mL d'eau distillée stérile et 1mL de SDS 10%) étaient ensuite ajoutés et le mélange était laissé dans la glace entre 5 et 8 minutes. Ensuite, 150 µL de potassium 3M pH = 5 permettaient l'obtention d'un précipité blanc après 5 minutes dans la glace. Le surnageant d'une centrifugation à 14 000rpm pendant 4 minutes à 4°C était ensuite récupéré. Cinq cent microlitres de Phénol-Chloroforme-alcool Isoamyle-Hydroxyquinoléine étaient alors ajoutés permettant de séparer les protéines des acides nucléiques. Après centrifugation 5 minutes à 10 000 rpm, la phase aqueuse était recueillie et mélangée à 1mL d'éthanol 95° froid puis laissée à -20°C toute la nuit ou à -80°C pendant 2-3 heures afin de permettre la précipitation de l'ADN plasmidique. Après centrifugation 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C, le surnageant était retiré afin de permettre une étape de lavage avec 500 µL d'éthanol 70° froid. Le surnageant était retiré et les culots étaient laissés à l'air libre pour évaporation totale de l'éthanol. Le culot était ensuite resuspendu dans de l'eau milliQ stérile. L'efficacité de l'extraction était ensuite vérifiée par migration sur gel d'agarose et coloration BET comme précédemment décrit sauf que le gel d'agarose était à 0,7% en raison de la taille des plasmides bien supérieure à celles des amplicons. Il est courant que la quantité de plasmides extraite soit trop faible pour être visible sur le gel. Dans ce cas, la PCR des gènes de résistance BLSE était faite sur l'extrait plasmidique afin de vérifier la présence du plasmide. Les bactéries pouvant contenir plusieurs plasmides (comme décrit dans l'introduction), il est important d'augmenter la probabilité d'avoir un seul plasmide dans la bactérie pour pouvoir l'analyser sans être parasité par les autres plasmides éventuellement présents. Pour cela, le but

est de transférer le plasmide porteur du gène BLSE à une bactérie connue ne contenant pas de plasmide.

5.2. Conjugaison

La conjugaison est un moyen de transfert d'ADN entre deux bactéries nécessitant un contact direct entre ces bactéries qui établissent un « pont cytoplasmique » permettant l'échange horizontal de matériel génétique. Pour cela, la souche donatrice (E-BLSE dans notre cas) et la souche « réceptrice » (sans plasmide) doivent avoir une résistance différente à deux antibiotiques. En effet, si la souche donatrice est résistante à un antibiotique A auquel la souche réceptrice est sensible et inversement pour l'antibiotique B, un milieu de culture contenant les antibiotiques A et B ne laissera pousser que les souches réceptrices ayant accepté le plasmide de résistance provenant de la bactérie donatrice. La souche réceptrice utilisée était la souche *E. coli* K12 résistante à la rifampicine si la souche donatrice y était sensible ou la souche *E. coli* C600 si la souche donatrice était déjà résistante à la rifampicine. Pour cela, la souche réceptrice était mise en culture dans un milieu BH liquide jusqu'à phase stationnaire (5 à 6 heures) et celle donatrice en phase exponentielle (3 heures) à 37°C en conditions aérobies sous agitation. Cinq cents microlitres de chaque culture étaient mélangés, centrifugés et le culot suspendu dans le reliquat de surnageant puis déposé sur un filtre Millipore de 15mm de diamètre avec pores de 0,45µm sur une gélose MH avec incubation 24 heures à 37°C. Après incubation, le filtre était rincé dans de l'eau distillée stérile et des dilutions de 10⁰ à 10⁻² étaient réalisées. Cette dilution était ensuiteensemencée sur une gélose MH contenant du céfotaxime 1mg/mL et soit de la rifampicine à 200mg/L soit de l'azide à 300mg/L en fonction de la souche réceptrice utilisée et de nouveau incubée pendant 24 heures à 37°C en conditions aérobies. L'antibiogramme des colonies ainsi isolées est alors déterminé comme décrit précédemment afin de s'assurer de la présence d'un phénotype de type BLSE du transconjugant.

Cependant, certains plasmides restent peu ou non conjugatifs et la conjugaison ne permet d'isoler de transconjugant. Dans ce cas, il est nécessaire de réaliser une transformation c'est-à-dire le transfert d'ADN nu de la bactérie E-BLSE à une souche réceptrice, ici sous l'effet de l'application d'un champ électrique.

5.3. Transformation

Pour réaliser cette transformation, il faut donc préparer des bactéries électrocompétentes, en l'occurrence à partir de souche d'*E.coli* Top 10. Pour cela, une culture pendant 12 heures de souches d'*E.coli* en milieu BH liquide à 37°C en conditions aérobies était réalisée. Un millilitre de cette culture était transféré dans 150mL de milieu LB, cette nouvelle culture étant stoppée en phase exponentielle (densité optique entre 0,5 et 0,7). Dans la glace, les cellules ainsi stoppées étaient lavées une première fois dans 15mL de glycérol 10% puis une deuxième et une troisième fois dans 10mL de glycérol 10%. Les cellules ainsi lavées étaient ensuite plongées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C.

Deux microlitres de l'extrait plasmidique sont ensuite ajoutés au tube eppendorf contenant les souches d'*E. coli* Top 10 rendues électrocompétentes. Cent microlitres du mélange extrait plasmidique – Top 10 sont introduits dans une cuve métallique qui est placée dans l'électroporateur Gene Pulser Biorad avec les paramètres suivants : voltage : 2.5kV, capacitance 25microF, résistance 200 ohms. Immédiatement après l'application du courant électrique, 1 mL de milieu MH liquide est ajouté et l'ensemble est transféré à 37°C en conditions aérobies sous agitation au moins 1 heure. Après cette incubation permettant aux bactéries de « récupérer » après l'électroporation, le milieu MH contenant les bactéries étaient centrifugé 5 minutes à 4 000 rpm, le surnageant jeté et le culot resuspendu dans 400µL de milieu MH puis ensemencé sur une boîte de gélose MH contenant du céfotaxime à 2mg/L après dilution de 10⁰ à 10⁻² et cultivé 24 heures à 37°C en conditions aérobies. Les colonies obtenues étaient ensuite isolées et un antibiogramme était réalisé pour confirmer leur phénotype BLSE.

5.4. Identification moléculaire des groupes d'incompatibilité plasmidique

La détermination des groupes d'incompatibilité plasmidique a été menée selon la méthode publiée par Alessandra Carattoli (79). Brièvement, 5 PCR multiplex et 3 PCR simplex permettent de rechercher les groupes FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Igamma, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, and FIIA. Les amorces, conditions de PCR et tailles d'amplicon attendues sont décrits dans l'article (79). L'intérêt de ces PCR est de pouvoir s'appliquer à une large variété de souches de bacilles à Gram négatif à la recherche des plasmides portant le plus fréquemment les gènes de résistance en Europe. Les témoins positifs de PCR étaient des souches présentes au laboratoire connues pour porter un plasmide de tel groupe

d'incompatibilité. Malheureusement, il n'existait pas de témoin positif pour chaque groupe d'incompatibilité.

5.5. Révélation des produits d'amplification par le BET

La méthode utilisée est la même que celle décrite précédemment pour les PCR amplifiant les gènes de résistance BLSE.

5.6. Séquençage d'un plasmide et analyse bioinformatique

Devant les difficultés d'identification des groupes d'incompatibilité, un plasmide porteur d'un gène partiellement amplifié par les amorces spécifiques de CTX-M9 et sans groupe d'incompatibilité plasmidique retrouvé a été séquencé. Pour cela, l'extrait plasmidique a été envoyé à la plateforme génome transcriptome de Bordeaux où la librairie de séquençage Illumina® Nextera a été utilisée puis le run lancé sur une flow cell Nano sur un séquenceur MiSeq Illumina®.

Concernant l'assemblage du plasmide en bioinformatique, les données fournies ont été nettoyées à l'aide du logiciel AfterQC (version 0.9.6). Pour l'assemblage à proprement parler, 4 logiciels différents ont été utilisés : Abyss (version 2.1.0), MIRA (version 4.9.6), Velvet (version 1.2.10), Spades (version 3.12.0). L'assemblage en résultant a ensuite été comparé.

6) Etude de l'association entre colonisation digestive à E-BLSE et microbiote

6.1. Sélection des patients

Tous les patients admis en Réanimation Médicale entre janvier et août 2018 pour lesquels l'écouvillon d'entrée était suffisamment chargé pour faire une 2^{ème} dilution après celle réalisée en routine par le laboratoire de Bactériologie furent inclus dans l'étude.

6.2. Prélèvements et stockage

L'écouvillon était conservé à +4°C au laboratoire de Bactériologie pendant 24h maximum. En cas de qualité suffisante de prélèvement, l'écouvillon était alors déchargé dans 250 µL de milieu MH liquide puis congelé à -80°C.

6.3.Extraction

L'extraction a été réalisée avec le kit QIAamp® Power Fecal® Pro DNA en ajoutant une étape de lyse mécanique sur Precellys Evolution pendant 2 cycles de 30 secondes chacun séparés par une pause de 30 secondes à 7000 rpm après l'agitation prévue par le fabricant.

6.4. Préparation de la librairie et séquençage

Une première PCR amplifiant la région cible a été réalisée avec 2,5µL d'ADN provenant de l'étape d'extraction dilué à 5ng/ µL, 5 µL des amorces ciblant les régions codant pour V3-V4 du gène de l'ARNr 16S ou ITS2 et 12,5 µL du mix réactionnel avec Taq de haute fidélité 2X KAPA Hifi HotStart Ready Mix. Les amorces utilisées pour la PCR ciblant les régions V3-V4 de l'ARNr 16S sont :

Forward Primer :

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3'

Reverse Primer :

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3'.

Celles pour ITS2 sont :

Forward Primer :

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGARTCATCGAATCTTT 3'

Reverse Primer :

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGATATGCTTAAGTTCAGCGGGT 3'

Après une phase de dénaturation de 3 minutes à 95°C, 25 cycles de 30 secondes à 98°C puis 30 secondes à 55°C puis 30 secondes à 72°C ont été appliqués. Une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 minutes finissait cette PCR pour obtention d'un amplicon de 460bp environ. Les adaptateurs de séquençage étaient ensuite ajoutés lors d'une seconde PCR selon les instructions du Nextera® XT Index kit. Le run de séquençage était ensuite lancé sur un Illumina® MiSeq flow cell V2.

6.5. Analyse bioinformatique

L'assignation taxonomique a été réalisée à l'aide du *pipe-line* DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) (297). Ce *pipe-line* permet sous le logiciel R d'éliminer les amorces, adaptateurs de séquençage et séquences chimériques. Il permet également de déterminer les séquences double brin à partir des divers amplicons dans le sens *forward* comme *reverse*. DADA2 permet d'analyser le compartiment bactérien du microbiote à partir de V3-V4 mais aussi le compartiment fongique à partir d'ITS2. Ce *pipe-line*, en assignant chaque séquence individuellement avant le regroupement en groupes de séquences homologues, permet de pouvoir comparer différents projets de différentes équipes à la condition d'avoir ciblé les mêmes régions hypervariables du gène codant pour l'ARN16S (298). Les analyses de diversité alpha et bêta ainsi que d'identification d'espèces associées au portage d'E-BLSE ont été réalisées à partir du *package* « Phyloseq » à l'aide du logiciel R version 3.6.0. Les analyses LefSe ont été réalisées grâce à l'interface Galaxy de l'équipe du Dr Huttenhower, inventeur de cette analyse, à Harvard (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

6.6. Ethique pour l'étude des microbiotes digestifs associés à la colonisation digestive à E-BLSE

L'exploitation des résultats et des données cliniques étaient faites après anonymisation dans le cadre d'une déclaration de Méthodologie de Référence 3 auprès de la « Commission Nationale Informatique et Libertés » puisque les données provenaient toutes du même service hospitalier.

Résultats

1) Dissémination clonale inter et intra patient des E-BLSE

Les résultats en lien avec les objectifs d'étude de l'implication de la dissémination clonale dans la transmission croisée et dans le lien colonisation-infection ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Antimicrobial resistance and Infection Control » (pages 93-99).

En résumé, un seul cas de transmission croisée (pour une souche de *K. pneumoniae*) a été retrouvé malgré 6 cas d'acquisition, lors du séjour en réanimation, de colonisation digestive par E-BLSE ce qui confirme que la dissémination clonale n'est plus un moteur majeur de dissémination entre patients des E-BLSE en réanimation.


Parmi 55 patients colonisés à E-BLSE, 38 développaient une infection au cours de leur séjour en réanimation avec seulement 6 (16%) cas d'infection prouvée à E-BLSE. Le fait d'être colonisé au niveau digestif à E-BLSE avait une VPP de 40% et une VPN de 100% pour l'implication d'une E-BLSE dans les PAVM survenant chez les porteurs d'E-BLSE. Quand la souche E-BLSE infectante était disponible pour analyse par PFGE, il s'agissait du même clone que la souche colonisante. Ces résultats suggèrent que la dissémination clonale des E-BLSE joue un rôle dans la diffusion des E-BLSE « intra-patient » mais que d'autres bactéries s'expandent également et limitent donc la probabilité d'infection par cette E-BLSE.

RESEARCH

Open Access



Extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacterales* faecal carriage in a medical intensive care unit: low rates of cross-transmission and infection

Renaud Prevel^{1,2*} , Alexandre Boyer¹, Fatima M'Zali², Thibaut Cockenpot³, Agnes Lasheras⁴, Véronique Dubois^{2,3} and Didier Gruson¹

Abstract

Background: Extended-spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacterales* (ESBL-E) are disseminating worldwide especially in Intensive Care Units (ICUs) and are responsible for increased health costs and mortality. The aims of this work were to study ESBL-E dissemination in ICU and to assess the impact of ESBL-E faecal carriage on subsequent infections during a non-outbreak situation.

Methods: We therefore screened every patient at admission then once a week in a medical ICU between January and June 2015. Each ESBL-E isolate was characterized by ESBL genes PCR amplification and the clonal dissemination was assessed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Results: Among the 608 screened patients, 55 (9%) were colonized by ESBL-E. Forty-four isolates were available for further analysis. Most of them (43/44, 98%) contained a ESBL gene from the CTX-M group. Only one case of ESBL-E cross-transmission occurred, even for acquired ESBL-E colonization. Subsequent infection by ESBL-E occurred in 6/55 (11%) patients and infecting ESBL-E strains were the colonizing ones. ESBL-E faecal carriage had a negative predictive value of 100% and a positive predictive value of 40% to predict ESBL-E ventilator associated-pneumonia (VAP). Alternatives to carbapenems consisting in piperacillin-tazobactam, ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam were all active on this panel of ESBL-E.

Conclusions: ESBL-E expansion and acquisition in ICU in a non-outbreak situation are not any more fully explained by cross-transmission. Mechanisms underlying ESBL-E dissemination in ICU are still to investigate. Interestingly, as far as we know, our study demonstrates for the first time by PFGE that the colonizing strain is indeed the infecting one in case of subsequent ESBL-E infection. Nevertheless, subsequent ESBL-E infection remains a rare event conferring poor positive predictive value for ESBL-E colonization to predict ESBL-E VAP. Relevance of systematic ESBL-E faecal screening at ICU admission and during ICU stay needs further investigation.

Keywords: Extended-spectrum beta-lactamase, Carriage, Cross-transmission, Infection, Ventilator-associated pneumonia, Intensive care

* Correspondence: renaud.prevel@hotmail.fr

¹Medical Intensive Care Unit, CHU Bordeaux, Pellegrin university hospital, Place Amélie Raba-Léon, F-33000 Bordeaux, France

²UMR 5234 CNRS, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The increase in antimicrobial resistance remains a major threat [1]. Among resistant bacteria, extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriales* (ESBL-E) are of special concern. In fact, ESBL-E faecal carriage is increasing worldwide [2, 3], especially in long term care facilities and ICUs, but even among healthy people with up to ten-fold increase in a 5 years French Survey [4, 5]. ESBL-E faecal carriage rates vary between western and non-western countries probably because of discrepancies in water sanitation procedures (from 1 to 6% in Europe and North America but up to 60% in India) [3]. Known risk factors are previous antibiotic exposure, previous admission to a healthcare facility, previous hospitalization and previous ESBL-E carriage [6–8]. Cross-transmission in ICU has been mainly described during outbreaks leading to enforcement of hygiene isolation procedures [9]. However, hygiene procedures were not able to fully prevent ESBL-E increase in ICU despite increased standard precautions and an efficient prevention from nosocomial cross-transmission [10, 11]. The environment of healthcare facilities (such as floors and walls contamination) was also suspected to play a role in ESBL-E cross-transmission but its role does not seem to be that important [12]. Finally, little is known about the mechanisms of ESBL-E faecal carriage dissemination during ICU stay in a non-outbreak situation when cross-transmission by healthcare workers is controlled by thorough hygiene procedures.

Moreover, to date, the link between ESBL-E faecal carriage and the risk of subsequent ESBL-E infection is not fully understood even if colonization by ESBL *Klebsiella pneumoniae* seems to be at higher risk than colonization by *Escherichia coli* [13]. A better understanding of this link between colonization and infection is of paramount importance since ESBL-E ICU infections lead to increased healthcare costs, length of stay and mortality [14]. In a non-ICU low-endemy environment, ESBL-E infections among ESBL-E faecal carriers were shown to be a rare event but this remains an issue regarding ICU patients, especially those developing ventilator-associated pneumonia (VAP) [15, 16]. The aim of this work was to assess the ESBL-E dissemination (acquisition and clonal transmission) and subsequent infection among ESBL-E faecal carriers in ICU during a non-outbreak situation.

Methods

Design of the study

From January 1st to June 30th 2015, all patients of the medical ICU at Pellegrin Hospital, a 1300-bed tertiary center, were screened by rectal swab at admission and then weekly until they were discharged and isolates were collected. Our ICU is divided into 2 ICU wards of respectively 13 and 14 beds and one 12 beds ward dedicated to post-intensive care, admitting 1200 patients per

year with a mean length of stay of 5 days. All patients were hospitalized in single rooms. Standard isolation procedures for all patients and contact isolation procedures for ESBL-E faecal carriers were applied according to the French Society of Hygiene guidelines [17] including hand hygiene procedures, dedicated medical supplies and single room.

For each ESBL-E carriers, demographic information, medical history, exposure to antibiotics for the past 12 months, prior ESBL-E fecal carriage for the past 12 months, hospitalization or health-care facility contact for the past 12 months and mortality at day 28 and year 1 were retrospectively collected through medical records. The patients were characterized as imported carriers if they were colonized at admission (from the community or from a non-ICU medical unit) and acquired carriers if the first screening was negative but any of the weekly screening was subsequently positive. Recording of patients suffering from VAP or pneumonia without intubation was made retrospectively through our prospective patient database. Patient status was assessed by two independent clinicians for all data including the confirmation of VAP diagnosis according to French current guidelines [18]. Bloodstream infection was defined by any positive blood culture except for coagulase-negative *Staphylococcus*.

Samples processing

Each rectal swab was inoculated on the chromID ESBL[®] plate for 16-24hours at 37°C. Confirmation of the presence of ESBL was assessed by MAST AMPC&ESBL detection discs D68C[®] (Mast Group). Identification of each selected colony was assessed by mass spectrometry (Maldi Biotyper Microflex[®], Bruker). If 2 different ESBL-E isolates were identified on a screening test, each isolate was characterized individually. In case of positive screening at admission, the isolates collected during weekly screenings were considered as duplicate if being the same species and carrying the same resistance genes and not investigated. Susceptibilities to ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam were assessed by E-test[®] (BioMérieux). ESBL-E isolates were then stored at -20°C.

ESBL type determination

Detection and characterization of *bla* genes were performed by multiplex PCRs for *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{OXA-1} and then confirmed by simplex PCRs [19].

Clonality assessment by pulsed-field gel electrophoresis

The clonality of ESBL-E dissemination in the ICU was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Xba*I-digested genomic DNA of all collected ESBL-E

isolates available as previously described [20]. Patterns were visually compared and analyzed according to previously reported criteria [21]. Plasmids were not analyzed by PFGE as concerns exist about its discriminative power.

Statistics analysis

Quantitative variables were summarized as mean \pm standard deviation or median (interquartile range). Categorical data were summarized as count (%).

Results

ESBL prevalence in ICU patients

Among 613 patients admitted to ICU during the 6 months study-period, 608 were screened (371 (61%) only at admission and 237 (39%) at admission and weekly during their ICU stay). Fifty-five (9%) were positive for ESBL-E faecal carriage. No ESBL-E outbreak was detected during the study. Only 6 (1%) patients acquired ESBL-E faecal carriage during their ICU stay (Figure 1): 2 came from the community and 4 were already hospitalized at our university hospital before the transfer in ICU. Mean time to acquisition was 31 (\pm 17) days, median time 30 (4-53) days. Each patient who acquired ESBL-E during ICU stay received several courses of broad-spectrum antimicrobial therapy between time of admission in ICU and ESBL-E acquisition.

ESBL-E faecal carriers' characteristics and risk factors

ESBL-E faecal carriers are described in Table 1. ESBL-E faecal carriers were mainly colonised with *Escherichia coli* (37/55, 67%), 37/47 (79%) patients had at least 1 risk factor of EBL-E faecal carriage with 32/47 (68%) having several risk factors (Table 2) including previous antimicrobial therapy Table 2.

ESBL-E clonality assessment by pulsed-field gel electrophoresis (Figs. 2 and 3)

Fifty-seven ESBL-E isolates from faecal carriage were collected from the 55 patients. Unfortunately, 13 isolates

were not available for analysis (loss of ESBL after freezing $n = 8$, the isolate did not grow after -20°C freezing $n = 83$, and the wrong isolate was frozen at -20°C $n = 82$). Among these 13 isolates, 10 were imported and 3 acquired in ICU. One of the missing acquired ESBL-E isolate was a *Citrobacter freundii* with no other patient carrying that bacteria during his/her stay in ICU. Forty-four isolates from faecal carriage were available for PFGE and 2 isolates from weekly samplings of imported ESBL-E faecal carriage were considered as duplicate and used as positive control (8C and 18C, Fig. 2).

No case of cross transmission regarding *E. coli* and only one case of *K. pneumoniae* cross transmission (39CT, Fig. 3) was identified. ESBL gene PCR identified 103 different ESBL-E genes mostly from *bla*_{CTX-M} (43, 42%), *bla*_{TEM} (27, 26%), *bla*_{OXA-1} (18, 17%) and *bla*_{SHV} (14, 15%) groups.

ESBL-E infections among carriers during ICU stay

Among the 55 ESBL-E faecal carriers, 38 were infected and 16 of them received carbapenems as part of empirical antimicrobial therapy during their ICU stay. Infection sites were distributed as follow: pulmonary infections 23/38, bloodstream infection 9/38 (5 patients having both pulmonary and bloodstream infections), skin infection 5/38, urinary tract infection 4/38, abdominal infection 2/38. Among the 38 infected ESBL-E faecal carriers, a non ESBL-E isolate was identified for 22 patients and 10 patients had no documentation because cultures remain sterile. Thus, only 6/38 patients were subsequently infected by an ESBL-E. None of these 6 ESBL-E infected patients had acquired the ESBL-E faecal carriage during their ICU stay. Respectively for *E. coli* and *K. pneumoniae* carriers, 2/37 (6%) and 4/16 (25%) were subsequently infected with ESBL-E.

The 6 ESBL-E infections were as follow: 2 ventilator-associated pneumonias (VAP), 2 pneumonias in non-intubated patients (2 *E. coli* and 2 *K. pneumoniae*), 1 bloodstream infection (*K. pneumoniae*) and 1 urinary

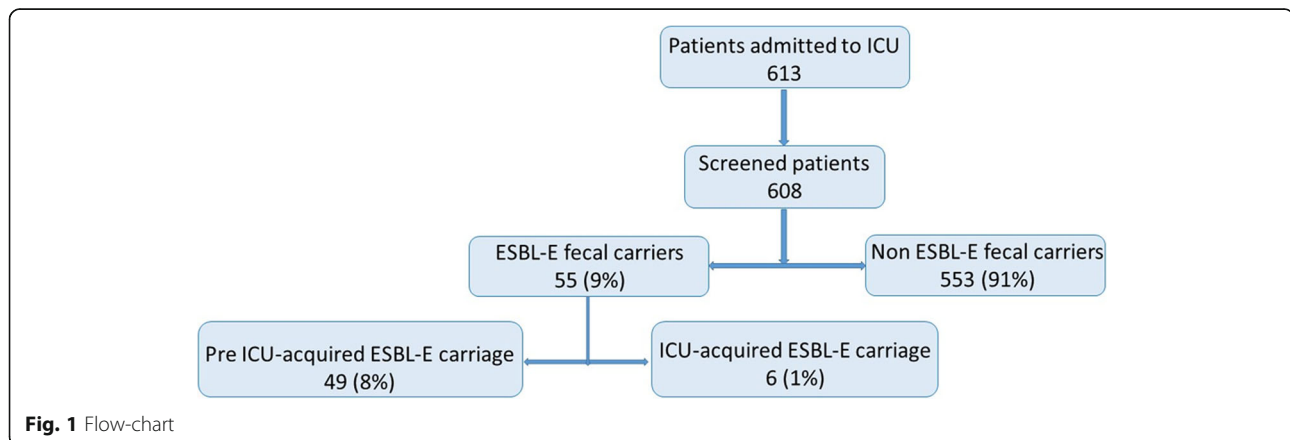


Fig. 1 Flow-chart

Table 1 ESBL-E faecal carriers' characteristics at admission

ESBL-E faecal carriers' characteristics at admission	Patients	(%age)
Age (years, mean \pm SD)	61	\pm 22
Sex ratio (women/men)	0,49	18/37
Simplified Acute Physiology Score 2 (mean \pm SD)	50	\pm 32
Admission from community	24/55	44%
Admission from another hospitalization unit	31/55	56%
D28 mortality	19/54	35%
1-year mortality	20/45	44%
<i>Escherichia coli</i> carriage	37/55	67%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carriage	16/55	29%
<i>Citrobacter koseri</i> carriage	2/55	3%
<i>Citrobacter freundii</i> carriage	1/55	3%
<i>Serratia fonticola</i> carriage	1/55	1%

tract infection (*K. pneumoniae*). Three isolates involved in pneumonia episodes (1 *K. pneumoniae*: 37I and 2 *E. coli*: 2I and 15I) were also available for PFGE analysis. The PFGE analysis, according to Tenover's criteria, classified the strains 15I and 37I as indistinguishable from strains 15 and 37 respectively and closely related which means probably the same strain for 2I when compared to strain 2 which confirmed that the same clone was involved in colonisation and infection (Figs. 2 and 3). Both VAP occurred early in the ICU course (2 and 3 days after intubation).

ESBL-E VAP prediction among ESBL-E faecal carriers

During the study, 433 patients received mechanical ventilation among whom 39 VAP were observed: 34 non-ESBL-E VAP among the non ESBL-E faecal carriers, 3 non-ESBL-E

Table 2 ESBL-E faecal carriage risk factors

ESBL-E faecal carriage risk factors	Patients	(%age)
ESBL-E previous colonization within 12 months	16/55	29%
Travel in a ESBL-E endemic area within 12 months	2/55	3,6%
Previous hospitalization within 12 months	37/55	67%
Health-care associated	26/55	47%
Previous antimicrobial therapy within 12 months	35/47	74%
Penicillin	26/41	63%
3rd generation cephalosporins	17/41	41%
Fluroquinolones	9/41	22%
Trimethoprim/sulfamethoxazole	7/41	17%
Aminoglycosids	9/41	22%
0 risk factor	10/47	21%
1 risk factor	5/47	11%
2 risk factors	9/47	19%
3 risk factors	12/47	26%
4 risk factors	11/47	23%
5 risk factors	0/47	0%

VAP among the ESBL-E faecal carriers ($n = 55$), 2 ESBL-E VAP among the ESBL-E faecal carriers and 0 ESBL-E VAP among the non ESBL-E faecal carriers. ESBL-E faecal carriage had thus a positive predictive value (PPV) of 40%, a negative predictive value (NPV) of 100%, a sensitivity of 100% and a specificity of 10% for ESBL-E causing the VAP.

Alternatives to carbapenems

In vitro, all the available isolates ($n = 44$) were susceptible to imipenem, ertapenem, ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam, 43/44 to temocillin and to piperacillin-tazobactam (according to the EUCAST 2016 Version 6.0 breakpoint recommendations).

Discussion

ESBL-E faecal carriage rate was 9% with only one case of ESBL-E cross-transmission whereas 6 cases of ESBL-E acquisition were observed. In case of subsequent ESBL-E infection, our data demonstrate that the colonizing ESBL-E strain is indeed involved but it remains a rare event conferring poor predictive value to ESBL-E colonization status for subsequent ESBL-E infection.

A prevalence of ESBL-E faecal carriage of 9% is consistent with a previous rate of 13,2% found in another study [22]. Most of the ESBL genes were of CTX-M group as previously described [2, 3]. Only 6 patients (1%) acquired ESBL-E faecal carriage during their stay in ICU and this can be over-estimated. In fact, the rate of false negatives is a major concern regarding ESBL-E screening by rectal swab and 2 patients acquired the ESBL-E in only 4 days, suggesting a possible false negative screening at admission [23].

However, the low rate of ESBL faecal carriage cross transmission (1%), even among patients acquiring faecal carriage in the ICU, underlines the respect of isolation procedures by ICU healthcare givers but also the limitation of these measures as suggested by Tschudin-Sutter et al. [10].

These results are consistent with those of three recent studies but our study is the first assessing ESBL-E clonal dissemination in ICU by PFGE. One shows no case of cross transmission with the respect of the sole standard hygiene precautions in 3 Dutch hospitals but the study did not focus on ICU [11]. The second found only two cases of cross transmission in a ICU with no single room but the major limitation of this work is that no clonal analysis (by PFGE or whole genome sequencing) was performed [22]. The third one found only one case of cross transmission in a medical ICU by repetitive element sequence-based PCR (repPCR) [24]. RepPCR is another tool to assess clonality based on the amplification of repetitive and non-coding parts of the genome but PFGE has a better ability to discriminate between *E. coli* isolates belonging to different subtypes [25]. New techniques such as whole genome sequencing or

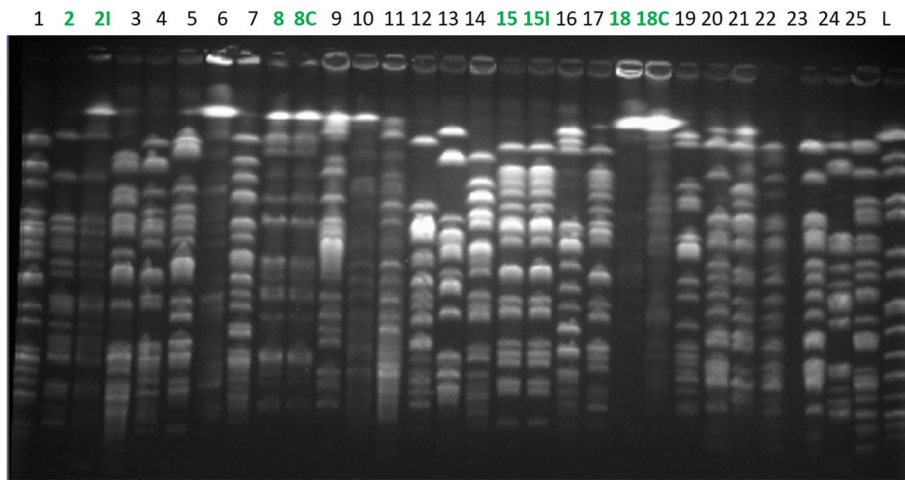


Fig. 2 PFGE analysis for *Escherichia coli* PFGE migration for *Escherichia coli* colonizing isolates. 8C and 18C: duplicate colonizing isolates used as positive control. 21 and 15: infecting isolates. L: ladder

Maldi-ToF clonality determination will provide an easier and faster assessment of cross-transmission avoiding time- and staff-consuming techniques as PFGE [26, 27].

These data suggest that other mechanisms than cross transmission occur in ICU and should be investigated to better fight ESBL-E faecal carriage acquisition. In fact, besides clonal dissemination, ESBL plasmid-mediated dissemination can occur with horizontal transfer of genetic determinants for antimicrobial resistance which is enhanced during the exposure to antibiotics [28]. Nevertheless, ESBL gene and plasmid incompatibility groups determinations (data not shown for incompatibility groups) do not suggest horizontal transfer to be involved even if definitive conclusions cannot be drawn for 8 of the strains.

Another mechanism could correspond to the expansion of a previously present but not detectable ESBL-E clone. This non detectable clone could be acquired in the community or during a previous hospitalization. Antimicrobial therapy before admission or at the early phase of the ICU stay is thought to favor such ESBL-E expansion [29].

The fact that only 6/38 ESBL-E faecal carriers with infection had a proven subsequent ESBL-E infection questions the systematic use of carbapenems in that case, currently a hot topic [30–32]. Piperacillin-tazobactam, ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam could represent safe alternatives to spare carbapenems [33–36]. Regarding piperacillin-tazobactam, the only randomized controlled trial available did not manage to prove the

3 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 37I 38 39CT 40 L

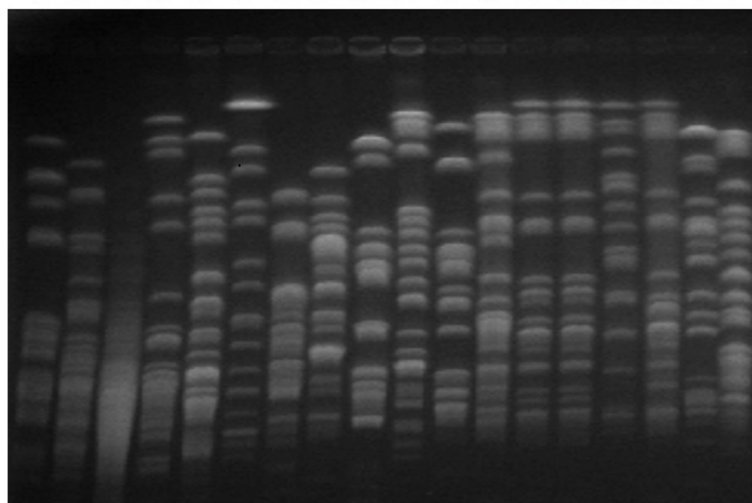


Fig. 3 PFGE analysis for *Klebsiella pneumoniae* PFGE migration for *Klebsiella pneumoniae* colonizing isolates. Patient 3 was colonized with both *E. coli* and *K. pneumoniae*. 37I: infecting strain. 39CT: isolate involved in cross-transmission. L: ladder

non-inferiority of piperacillin-tazobactam compared with meropenem for the documented treatment of BSI due to 3CG-resistant *E.coli* or *K. pneumoniae* but some limitations apply and so the results should be interpreted cautiously [37, 38]. Nevertheless, in case of high-inoculum or in case of septic shock, carbapenems use remains a gold standard according to the current guidelines [16, 23].

This study confirms that ESBL-E VAP is a rare event even among ESBL-E carriers and that ESBL-E faecal carriage has a very good NPV for ESBL-E VAP but a poor PPV [39] but it demonstrates for the first time that the infecting strain corresponds to the colonizing one in case of subsequent ESBL-E infection. The low rate of VAP (39/433, 9%) in this cohort can decrease the PPV of ESBL-E faecal carriage for subsequent infection.

Besides, infection by ESBL-E seems to be more frequent in the case of *Klebsiella pneumoniae* than *Escherichia coli* as previously suggested [13, 40]. Unfortunately, in front of the small number of events we cannot definitely conclude here.

Our study has some limitations. First some isolates were missing (3 regarding acquired ESBL-E faecal carriage) and we cannot exclude other cases of cross-transmission. Nevertheless, one of the 3 missing isolates was a *Citrobacter freundii* with no other patient carrying a ESBL *Citrobacter freundii* at that time excluding a cross-transmission in that case.

Systematic ESBL-E faecal carriage screening has long been a standard of care for ICU-hospitalized patients but those results question the relevance of screening procedures. In other terms, the paradigm of ESBL-E faecal carriage in ICU patients is changing with a low rate of cross transmission and a majority of imported ESBL-E.

Investigation of the mechanisms leading to plasmid-mediated dissemination or to the expansion of ESBL clones up to detectable ESBL faecal carriage is also needed to resolve ESBL-E colonization issue.

Conclusions

In this single-centre ICU study, a 9% rate of ESBL-E faecal carriers was observed. Only 1% of patients acquired the ESBL-E faecal carriage during their ICU stay with only one case of cross-transmission. Interestingly, as far as we know, our study demonstrates for the first time by PFGE that the colonizing strain is indeed the infecting one in case of subsequent ESBL-E infection. Nevertheless, only 6/55 ESBL-E faecal carriers were subsequently infected by a proven ESBL-E strain. A negative ESBL-E faecal carriage ruled out its participation in VAP but positive predictive value was poor. The paradigm of ICU transmitted ESBL-E faecal carriage may be changing with a majority of imported ESBL-E and a low rate of cross transmission. Relevance of systematic ESBL-E faecal screening at ICU admission and during ICU stay needs further investigation.

Abbreviations

ESBL-E: Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriales*; ICU: Intensive care unit; NPV: Negative predictive value; PCR: Polymerase-chain reaction; PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis; PPV: Positive predictive value; repPCR: Repetitive element sequence-based PCR; VAP: Ventilator-associated pneumonia

Acknowledgements

We thank Mrs Catherine Andre for technical assistance and the medical ICU team.

Authors' contributions

TC collected the strains, RP performed the collection of patients' data, the PCR and the PFGE and wrote the manuscript, AL participate to the collection of patients' data, DG and VD designed the study, FMZ, AB, DG, AL and VD substantially revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by "Centre National de la Recherche Scientifique" UMR 5234, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité and Pellegrin university hospital (Bordeaux, France) subventions.

Availability of data and materials

The datasets generated during the current study are not publicly available due to the recommendations of French law regarding patients' data but are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

According to the French legislation, all patients or family were informed and non-opponent to the collect and analysis of the bacterial strains and the use of their data.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

RP, FMZ, TC, AL, VD and DG have not conflict of interest to declare. AB reports congress fees from Pfizer and Gilead and a symposium moderation for Basilea.

Author details

¹Medical Intensive Care Unit, CHU Bordeaux, Pellegrin university hospital, Place Amélie Raba-Léon, F-33000 Bordeaux, France. ²UMR 5234 CNRS, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France. ³Bacteriology laboratory, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France. ⁴Hygiene unit, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

Received: 22 March 2019 Accepted: 4 July 2019

Published online: 10 July 2019

References

- Carlet J. The World Alliance Against Antibiotic Resistance: Consensus for a Declaration. *Clin Infect Dis*. 2015;60:1837–41.
- Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andreumont A. Trends in Human Faecal Carriage of Extended-Spectrum -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:744–58.
- Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Faecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 2016;63:310–8.
- Flokas ME, Alevizakos M, Shehadeh F, Andreatos N, Mylonakis E. ESBL-producing *Enterobacteriaceae* Colonization in Long-Term Care Facilities (LTCFs): A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 [cited 2017 Oct 6]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857917302959>.
- Nicolas-Chanoine M-H, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, Bert F, et al. 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:562–8.

6. Boyer A, Couallier V, Clouzeau B, Lasheras A, M'zali F, Kann M, et al. Control of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae nosocomial acquisition in an intensive care unit: A time series regression analysis. *Am J Infect Control*. 2015;43:1296–301.
7. Zahar J-R, Lesprit P, Ruckly S, Eden A, Hikombo H, Bernard L, et al. Predominance of healthcare-associated cases among episodes of community-onset bacteraemia due to extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:67–73.
8. Aman M, Gudiol C, Calatayud L, Liñares J, Dominguez MÁ, Batlle M, et al. Risk factors for, and clinical relevance of, faecal extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) carriage in neutropenic patients with haematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:355–60.
9. Asakura T, Ikeda M, Nakamura A, Kodera S. Efficacy of empirical therapy with non-carbapenems for urinary tract infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Infect Dis*. 2014;29:91–5.
10. Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Strandén A, Widmer AF. Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae without contact isolation. *Clin Infect Dis*. 2012;55:1505–11.
11. Souverein D, Euser SM, Hesters BL, Hattink C, Houtman P, Popma A, et al. No nosocomial transmission under standard hygiene precautions in short term contact patients in case of an unexpected ESBL or Q&A *E. coli* positive patient: a one-year prospective cohort study within three regional hospitals. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6. [cited 2017 Oct 6] Available from: <http://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-017-0228-6>.
12. Dziri R, Klibi N, Alonso CA, Said LB, Bellaaj R, Slama KB, et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Citrobacter* obtained in environmental samples of a Tunisian hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86:190–3.
13. Gorrie CL, Mirčeta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;65:208–15.
14. Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti-Infect Ther*. 2013;11:321–31.
15. Lindblom A, Karami N, Magnusson T, Åhrén C. Subsequent infection with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in patients with prior infection or fecal colonization. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2018;37:1491–7.
16. Bruyère R, Vigneron C, Bador J, Aho S, Toitot A, Quenot J-P, et al. Significance of Prior Digestive Colonization With Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Patients With Ventilator-Associated Pneumonia. *Crit Care Med*. 2015;1.
17. Société française d'hygiène hospitalière (SF2H). Prévention de la transmission croisée: précautions complémentaires contact. 2009;XII:81.
18. ADARPEF, GFRUP, Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, et al. Brief summary of French guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of hospital-acquired pneumonia in ICU. *Ann Intensive Care*. 2018;8. [cited 2018 Dec 7] Available from: <https://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-018-0444-0>.
19. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay J-L, Herrmann J-L, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;209:161–8.
20. Saenz Y, Brinas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3996–4001.
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233.
22. Repessé X, Artiguenave M, Paktoris-Papine S, Espinasse F, Dinh A, Charron C, et al. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in an intensive care unit with no single rooms. *Ann Intensive Care*. 2017;7. [cited 2017 Oct 6] Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0295-0>.
23. Dyakova E, Bisnauthsing KN, Querol-Rubiera A, Patel A, Ahanonu C, Tosas Auguet O, et al. Efficacy and acceptability of rectal and perineal sampling for identifying gastrointestinal colonization with extended spectrum β -lactamase Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23:577.e1–3.
24. Alves M, Lemire A, Decré D, Margetis D, Bigé N, Pichereau C, et al. Extended-spectrum beta-lactamase – producing enterobacteriaceae in the intensive care unit: acquisition does not mean cross-transmission. *BMC Infect Dis*. 2016;16. [cited 2017 Oct 6] Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1489-z>.
25. Bae IK, Kim J, Sun JYH, Jeong SH, Kim Y-R, Wang K-K, et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of *Escherichia coli* clinical isolates. *Indian J Med Res*. 2014;140:679–85.
26. Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C, McCorrister SJ, Chong P, Wylie J, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J Microbiol Methods*. 2013;94:180–91.
27. Ruppé E, Ghoulane A, Tap J, Pons N, Alvarez A-S, Maziers N, et al. Prediction of the intestinal resistome by a three-dimensional structure-based method. *Nat Microbiol*. 2018 [cited 2018 Dec 7]; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41564-018-0292-6>.
28. Woerther P-L, Angebault C, Jacquier H, Hugede H-C, Janssens A-C, Sayadi S, et al. Massive increase, spread, and exchange of extended spectrum β -lactamase-encoding genes among intestinal Enterobacteriaceae in hospitalized children with severe acute malnutrition in Niger. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2011;53:677–85.
29. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev*. 2017;279:90–105.
30. Stupica D, Lusa L, Klevišar MN, Terzić S, Pirš M, Premru MM, et al. Should we consider faecal colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in empirical therapy of community-onset sepsis? *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50:564–71.
31. Carbonne H, Le Dorze M, Bourrel A-S, Poupet H, Poyat C, Cambau E, et al. Relation between presence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in systematic rectal swabs and respiratory tract specimens in ICU patients. *Ann Intensive Care*. 2017;7. [cited 2017 Oct 6] Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0237-x>.
32. Jalalzai W, Boutrot M, Guinard J, Guigon A, Bret L, Poisson D-M, et al. Cessation of screening for intestinal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a low-endemicity intensive care unit with universal contact precautions. *Clin Microbiol Infect*. 2017 [cited 2017 Dec 4]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X17304329>.
33. Boucher A, Meybeck A, Patoz P, Valette M, Thellier D, Delannoy PY, et al. Alternatives to carbapenems in ventilator-associated pneumonia due to ESBL-producing Enterobacteriaceae. *J Inf Secur*. 2016;73:293–6.
34. Torres A, Zhong N, Pachl J, Timsit J-F, Kollef M, Chen Z, et al. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:285–95.
35. Wagenlehner FM, Umeh O, Steenbergen J, Yuan G, Darouiche RO. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: a randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI). *Lancet Lond Engl*. 2015;385:1949–56.
36. Timsit J-F, Pilmis B, Zahar J-R. How Should We Treat Hospital-Acquired and Ventilator-Associated Pneumonia Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae? *Semin Respir Crit Care Med*. 2017;38:287–300.
37. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, Mo Y, Lee TH, Yilmaz M, et al. Effect of Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for Patients With *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection and Ceftriaxone Resistance: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2018;320:984–94.
38. Prevel R, Berdai D, Boyer A. Antibiotics for Ceftriaxone-Resistant Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections. *JAMA*. 2019;321:613.
39. Razzi K, Mekontso Dessap A, Carteaux G, Jansen C, Decousser J-W, de Prost N, et al. Frequency, associated factors and outcome of multi-drug-resistant intensive care unit-acquired pneumonia among patients colonized with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Ann Intensive Care*. 2017;7:61.
40. Gurieva T, Dautzenberg MJD, Gniadkowski M, Derde LPG, Bonten MJM, Bootsma MCJ. The Transmissibility of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Intensive Care Units. *Clin Infect Dis*. 2018;66:489–93.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2) Dissémination plasmidique

Dans un premier temps, nous avons analysé les groupes d'incompatibilité plasmidique de chaque plasmide isolé à partir d'un conjuguant ou transformant. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Groupe d'incompatibilité plasmidique des plasmides portant les gènes codant pour des enzymes BLSE au sein des souches isolées en portage digestif en réanimation

Gènes portés sur le plasmide	Groupe d'incompatibilité plasmidique (nombre de souches)
CTX-M-1	IncP (2) Inconnu (2)
CTX-M-1 + SHV112	Inconnu (1)
CTX-M-1 + TEM-1	IncF (2) Inconnu (1)
CTX-M-1 + TEM-2	Inconnu (1)
CTX-M-14	IncF (2) IncFiC (1) IncP (1) Inconnu (4)
CTX-M-14 + OXA-1	IncF (1)
CTX-M-14 + TEM-1	Inconnu (3)
CTX-M-14 + TEM-2	IncY (1)
CTX-M-15	IncY (2) IncF (1)
CTX-M-15 + OXA-1	IncF (2) IncP (1) IncY (1) Inconnu (2)
CTX-M-15 + TEM-1	IncF (3) IncP (1) Inconnu (1)
CTX-M-15 + TEM-2	IncF (1) Inconnu (1)
CTX-M-15 + TEM-1 + Oxa-1	Inconnu (6)

Nous avons eu un problème avec un plasmide pour lequel nous n'avions ni groupe d'incompatibilité plasmidique ni séquence du gène de résistance car la séquence était tronquée (amplificon obtenu à partir des amorces génériques amplifiant la région codant pour les enzymes du groupe CTX-M-9). Nous avons alors décidé de réaliser le séquençage de ce plasmide. Pour des raisons budgétaires, nous avons réalisé ceci avec un séquençage « short-read » mais nous avons eu la chance de pouvoir reconstituer ce plasmide avec l'aide des bioinformaticiens du Centre de Bioinformatique de Bordeaux.

Tableau 3 : Résultats de l'assemblage du plasmide

Logiciel	Fichier	Nombre de séquences	Taille totale
Abyss	Contigs (c)	13	71 218 nt
MIRA	Contigs (c)	4 046	2 567 254 nt
MIRA	Large contigs (lc)	54	166 389 nt
Velvet	Contigs (c)	101 918	11 983 830 nt
Spades	Contigs (c)	4 574	3 759 865 nt
Spades	Scaffolds (s)	4 569	3 760 005 nt

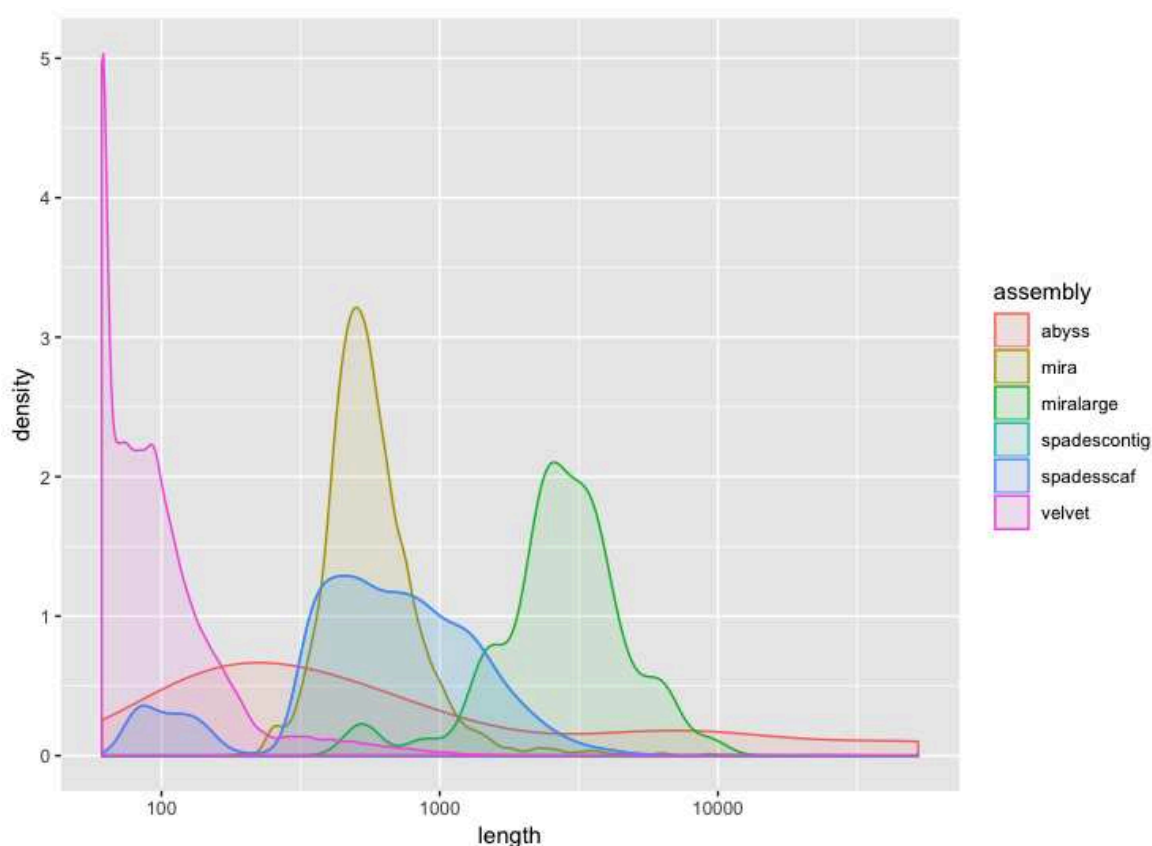


Figure 13 : Distribution de la taille des contigs obtenus après assemblage à l'aide des différents logiciels utilisés.

L'assemblage selon le logiciel Velvet étant très morcelé, nous avons exclu cette analyse. Le logiciel d'assemblage permettant l'obtention de contigs de la taille estimé du plasmide est MIRA large contigs.

Nous avons ensuite aligné la séquence de référence du gène blaCTX-M-9 à l'aide du logiciel BLAST (version 2.7.1plus) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/FJ668794.1>). Cette analyse a permis d'identifier 4 positions pour lesquelles les 3 logiciels d'assemblage donnaient la même base, différente de la séquence de référence (Figure 14).

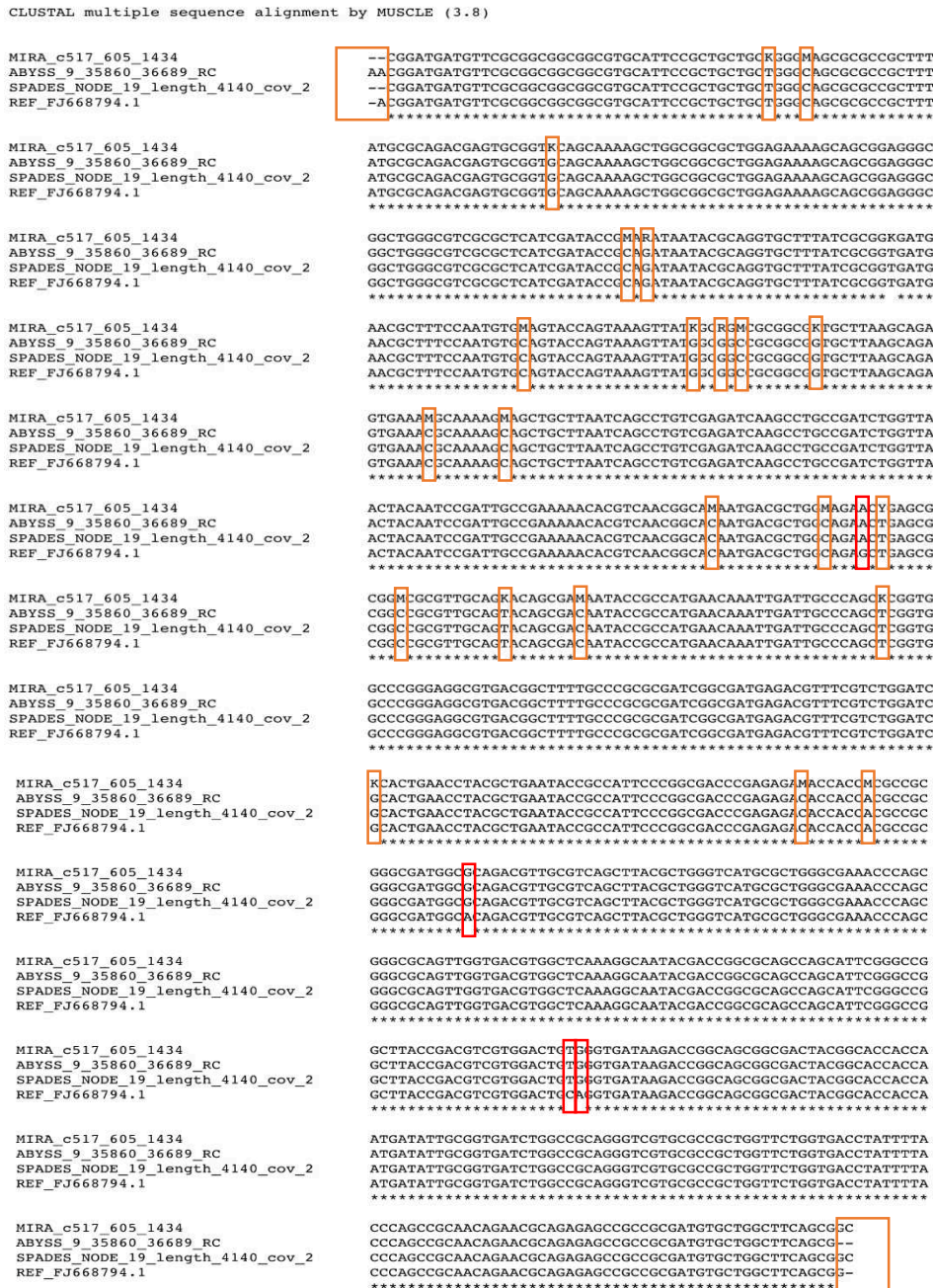


Figure 14 : Alignement des assemblages obtenus comparés à la séquence de référence. En rouge, nucléotide identique dans les 3 assemblages mais différent de la séquence de référence. En orange, positions pour lesquelles le logiciel MIRA utilise le code IUPAC pour les bases ambiguës (par exemple K pour T ou G).

Nous avons ensuite voulu savoir si les substitutions nucléotidiques induisaient des substitutions d'acide aminé. Nous avons ainsi pu identifier la substitution d'une alanine par une valine en position 226 (Figure 15) permettant d'identifier la séquence protidique de l'enzyme CTX-M-14.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

ABYCC_9_35860_36689_RC_rframe3_ORF          MMFAAAACIPLLLGSAPLYAQTSAVQQKLAALEKSSGGRLGVALIDTADNTQVLYRGDER   60
SPADES_NODE_19_length_4140_cov_2_rframe1_ORF MMFAAAACIPLLLGSAPLYAQTSAVQQKLAALEKSSGGRLGVALIDTADNTQVLYRGDER   60
REF_FJ668794.1_rframe2_ORF                MMFAAAACIPLLLGSAPLYAQTSAVQQKLAALEKSSGGRLGVALIDTADNTQVLYRGDER   60
*****

ABYCC_9_35860_36689_RC_rframe3_ORF          FPMCSTSKVMAAAAVLKQSETQKQLLNQPVEIKPADLVNYPNIAEKHVNGMTLAELSA    120
SPADES_NODE_19_length_4140_cov_2_rframe1_ORF FPMCSTSKVMAAAAVLKQSETQKQLLNQPVEIKPADLVNYPNIAEKHVNGMTLAELSA    120
REF_FJ668794.1_rframe2_ORF                FPMCSTSKVMAAAAVLKQSETQKQLLNQPVEIKPADLVNYPNIAEKHVNGMTLAELSA    120
*****

ABYCC_9_35860_36689_RC_rframe3_ORF          ALQYSDNTAMNKLIAQLGGPGGVTAFARAIGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPDRTTTPRA  180
SPADES_NODE_19_length_4140_cov_2_rframe1_ORF ALQYSDNTAMNKLIAQLGGPGGVTAFARAIGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPDRTTTPRA  180
REF_FJ668794.1_rframe2_ORF                ALQYSDNTAMNKLIAQLGGPGGVTAFARAIGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPDRTTTPRA  180
*****

ABYCC_9_35860_36689_RC_rframe3_ORF          MAQTLRQLTLGHALGETQRAQLVTWLKGNTTGAASIRAGLPTSWTVGDKTGSGDYGTND   240
SPADES_NODE_19_length_4140_cov_2_rframe1_ORF MAQTLRQLTLGHALGETQRAQLVTWLKGNTTGAASIRAGLPTSWTVGDKTGSGDYGTND   240
REF_FJ668794.1_rframe2_ORF                MAQTLRQLTLGHALGETQRAQLVTWLKGNTTGAASIRAGLPTSWTVGDKTGSGDYGTND   240
*****

ABYCC_9_35860_36689_RC_rframe3_ORF          IAVIWPQGRAPLVLVTYFTQPQQAESRRDVLASA   275
SPADES_NODE_19_length_4140_cov_2_rframe1_ORF IAVIWPQGRAPLVLVTYFTQPQQAESRRDVLASA   275
REF_FJ668794.1_rframe2_ORF                IAVIWPQGRAPLVLVTYFTQPQQAESRRDVLASA   275
*****

```

Figure 15 : Analyse de la séquence protidique indiquant la substitution d'un acide aminé alanine par une valine en position 226.

Enfin, l'annotation du plasmide a permis d'obtenir la cartographie suivante (Figure 16) :

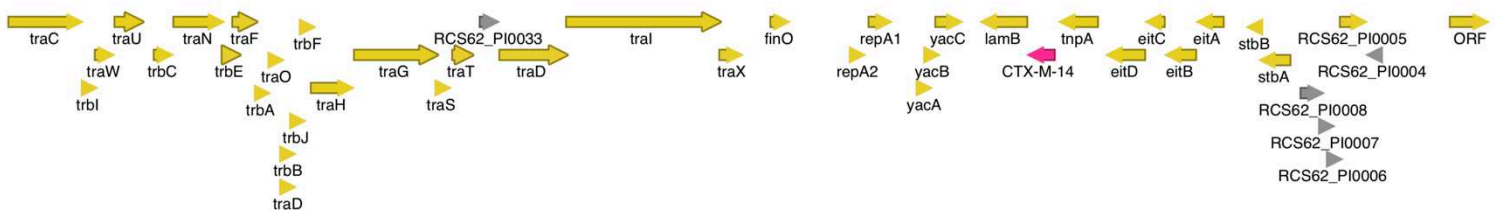


Figure 16 : cartographie plasmidique avec identification du gène *bla_{CTX-M-14}*.

En résumé, la dissémination plasmidique a probablement un rôle dans la dissémination des E-BLSE dans l'environnement comme discuté dans l'introduction. Cette dissémination plasmidique pourrait également avoir un rôle dans la dissémination de ces E-BLSE en réanimation. Cependant, nos résultats ne permettent pas d'en apprécier l'importance. Ils permettent uniquement d'exclure la présence d'un plasmide hégémonique suffisant à expliquer toute la diffusion des E-BLSE.

3) Comparaison des microbiotes digestifs des patients **colonisés** à E-BLSE à ceux **non colonisés** à E-BLSE

Dix-neuf patients colonisés au niveau digestif par une E-BLSE ont pu être inclus, 11 par *E. coli*, 6 par *K. pneumoniae* et 2 par *E. aerogenes*. Trente-huit patients appariés sur l'âge et le sexe non colonisés au niveau digestif par une E-BLSE ont été utilisés comme contrôle.

3.1. Comparaison des bactériobiotés

Il n'y avait pas de différence observée de diversité alpha selon les index de Shannon, Simpson et Evenness (respectivement $p = 0,55$; $p = 0,78$; $p = 0,99$) (Figure 17) ni de diversité bêta (permanova, p ajusté : 0.81) (Figure 18) entre les bactériobiotés des patients colonisés à E-BLSE et ceux non colonisés.

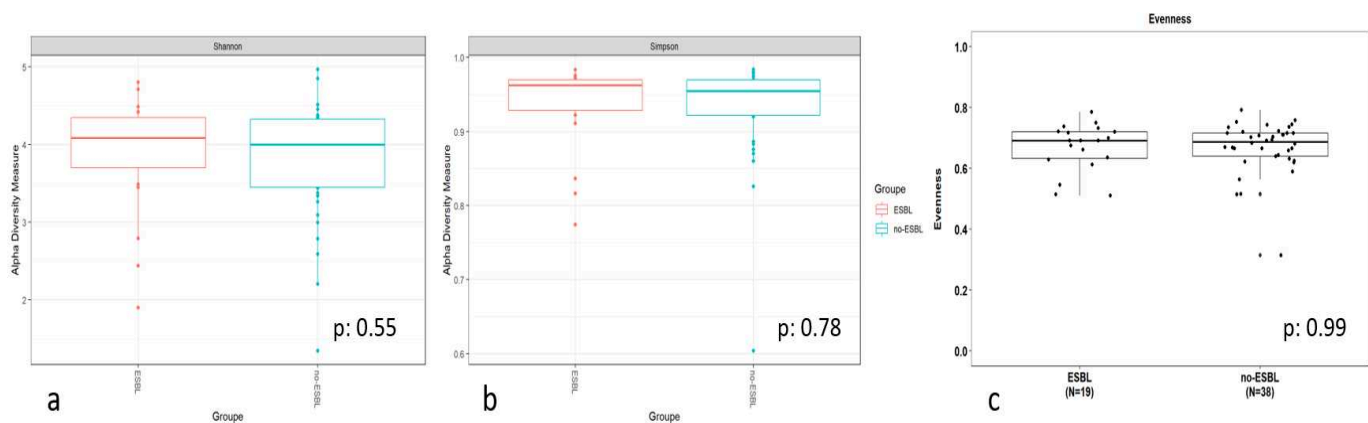


Figure 17 : Comparaison des diversités alpha des bactériobiotés digestifs en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE. a : index de Shannon. b : index de Simpson. c : evenness. Rouge : patients colonisés au niveau digestif à E-BLSE. Bleu : patients non colonisés au niveau digestif à E-BLSE

Comme nous suspectons des interactions entre espèces composant le microbiote, nous avons ensuite décidé de comparer les bactériobiotés des 11 patients colonisés par *E. coli* BLSE à ceux des 6 patients colonisés par *K. pneumoniae* BLSE. Nous n'avons pas comparé les patients colonisés par *E. aerogenes* car ils n'étaient que 2.

Les diversités alpha des bactériobiotés des patients colonisés à *E. coli* BLSE étaient significativement plus élevées que celles des patients colonisés à *K. pneumoniae* BLSE (respectivement pour les index Shannon, Simpson et evenness, $p = 0,02$; $p = 0,007$ et $p = 0,007$) (Figure 19). En revanche, il n'y avait pas de différence observée de diversité bêta entre ces 2 groupes (permanova, p ajusté = 0,44).

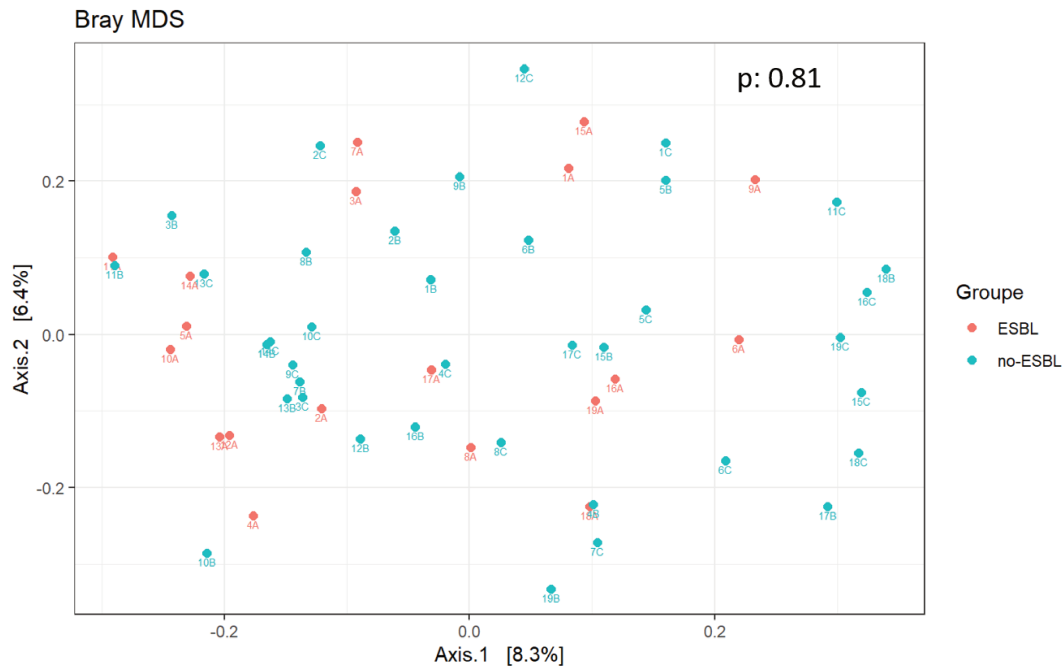


Figure 18 : Analyse de la diversité beta des bactériotes digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE.

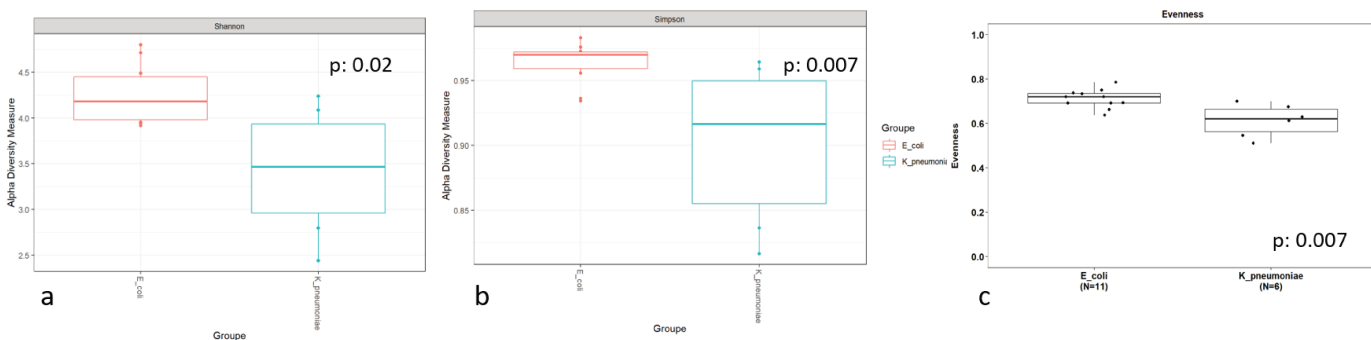


Figure 19 : Comparaison des diversités alpha des bactériotes digestifs en fonction de l'espèce d'E-BLSE responsable de la colonisation digestive. a : index de Shannon. b : index de Simpson. c : evenness. Rouge : *E. coli* BLSE. Bleu : *K. pneumoniae* BLSE. Rouge : patients colonisés au niveau digestif à E-BLSE. Bleu : patients non colonisés au niveau digestif à E-BLSE

Ces différences de diversité alpha entre les bactériotes des patients colonisés par *E. coli* ou *K. pneumoniae* BLSE ont renforcé notre décision d'analyser séparément les bactériotes en fonction.

Nous avons alors comparé les bactériotes des patients colonisés par *E. coli* BLSE à ceux des patients de même âge et de même sexe non colonisés par une E-BLSE. Nous n'avons pas observé de différence de diversité alpha entre les bactériotes des patients colonisés à *E. coli* BLSE comparés à ceux des patients non colonisés par une E-BLSE (respectivement pour les index Shannon, Simpson et evenness, $p = 0,06$; $p = 0,09$ et $p = 0,18$). Nous n'avons pas observé

de différence de diversité bêta entre les 2 groupes (permanova, p ajusté = 0,69). En revanche, l'absence de colonisation par *E. coli* BLSE était significativement associée à la présence de *Sellimonas intestinalis* appartenant au genre *Clostridium* cluster XIVa) (Figure 20). Cette analyse signifie que *Sellimonas intestinalis* a une abondance relative 1000 fois plus importante dans les bactériotes des patients non colonisés par une E-BLSE que dans les bactériotes des patients colonisés par *E. coli* BLSE. Lors de l'analyse des ASV associés à la colonisation par *E. coli* BLSE, un ASV correspondant à *E. coli* était bien retrouvé dans notre analyse.

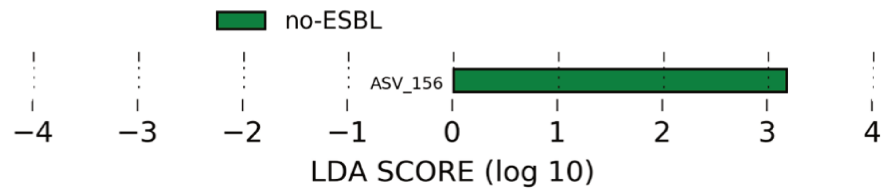


Figure 20 : Comparaison par analyse LefSe des ASV bactériens associés, au sein des bactériotes digestifs, à la colonisation digestive à *E. coli* BLSE. ASV_156 : *Sellimonas intestinalis*

A l'inverse, la diversité alpha des bactériotes des patients colonisés par *K. pneumoniae* BLSE était significativement plus basse que celle des patients non colonisés de même âge et même sexe (respectivement pour les index Shannon, Simpson et evenness, $p = 0,12$; $p = 0,05$ et $p = 0,03$) (Figure 21). Il n'y avait pas de différence de diversité bêta entre les 2 groupes (permanova, p ajusté = 0,8).

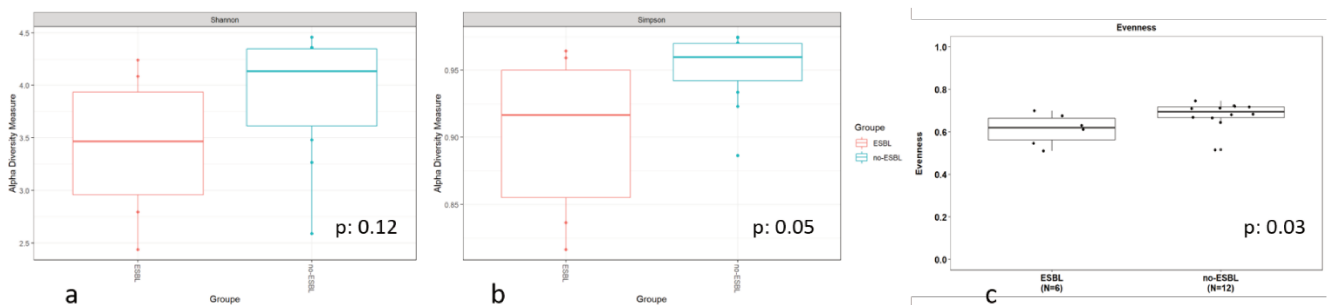


Figure 21 : Comparaison des diversités alpha des bactériotes digestifs en fonction de la colonisation digestive à *K. pneumoniae* BLSE. a : index de Shannon. b : index de Simpson. c : evenness. Rouge : patients colonisés au niveau digestif à *K. pneumoniae* BLSE. Bleu : patients non colonisés au niveau digestif à *K. pneumoniae* BLSE

Nous avons identifié un consortium de 11 ASV bactériens représentant 7 genres bactériens (*Porphyromonas*, *Clostridium* cluster XI, *Campylobacter*, *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium* et *Peptococcus*) associés à l'absence de colonisation par *K. pneumoniae* BLSE (Figure 22). Lors de l'analyse des ASV associés à la colonisation par *K. pneumoniae* BLSE, un ASV correspondant à *K. pneumoniae* était bien retrouvé dans notre analyse.

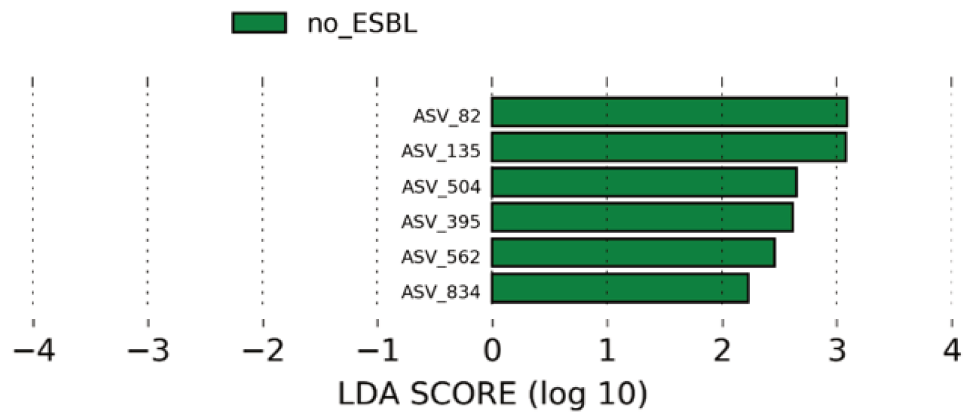


Figure 22 : Comparaison par analyse LefSe des ASV bactériens associés, au sein des bactériobiotes digestifs, à la colonisation digestive à *K. pneumoniae* BLSE. ASV_131 : *Porphyromonas* sp. ASV_135 : *Porphyromonas* sp. ASV_154 : *Clostridium* cluster XI (*Peptoniphilus* sp.) ASV_88: *Clostridium* cluster XI (*Anaerococcus* sp.) ASV_103: *Campylobacter ureolyticus* ASV_15: *Campylobacter hominis* ASV_241: *Prevotella* sp. ASV_291: *Prevotella* sp. ASV_73: *Dialister invisus* ASV_386: *Atopobium* sp. ASV_691: *Peptococcus* sp.

La colonisation digestive par *E. coli* BLSE ou *K. pneumoniae* BLSE ne semble donc pas être associée aux mêmes perturbations du microbiote. La colonisation par *E. coli* BLSE semble être associée à une perturbation qualitative mais pas quantitative du bactériobiote avec la disparition de *Sellimonas intestinalis* et l'émergence d'autres espèces bactériennes comme *E. coli*.

La colonisation par *K. pneumoniae* BLSE semble, elle, être associée à des anomalies quantitatives et qualitatives avec la disparition d'un consortium bactérien.

3.2. Comparaison des mycobiotes

Il n'y avait pas de différence observée de diversité alpha selon les index de Shannon, Simpson et Evenness (respectivement $p = 0,97$; $p = 0,82$; $p = 0,68$) (Figure 23) ni de diversité bêta (permanova, p ajusté = 0,42) (Figure 24) entre les mycobiotes des patients colonisés à E-BLSE et ceux non colonisés. Il n'y avait pas non plus de différence de diversité alpha (respectivement $p = 0,55$; $p = 0,59$; $p = 0,81$) ni de bêta diversité (permanova, p ajusté = 0,79) des mycobiotes des patients colonisés par *E. coli* BLSE comparés à ceux des patients colonisés par *K. pneumoniae* BLSE.

Cependant, *Candida albicans* significativement plus abondant chez les patients colonisés par *E. coli* BLSE par rapport à ceux non colonisés (Figure 25).

Concernant la colonisation par *K. pneumoniae*, 2 ASV correspondant à des *Saccharomyces* sp. étaient associés à l'absence de colonisation et des 4 ASV correspondant à *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Dipodascus geotrichum* et *Saccharomyces* sp. étaient associés à la colonisation (Figure 26).

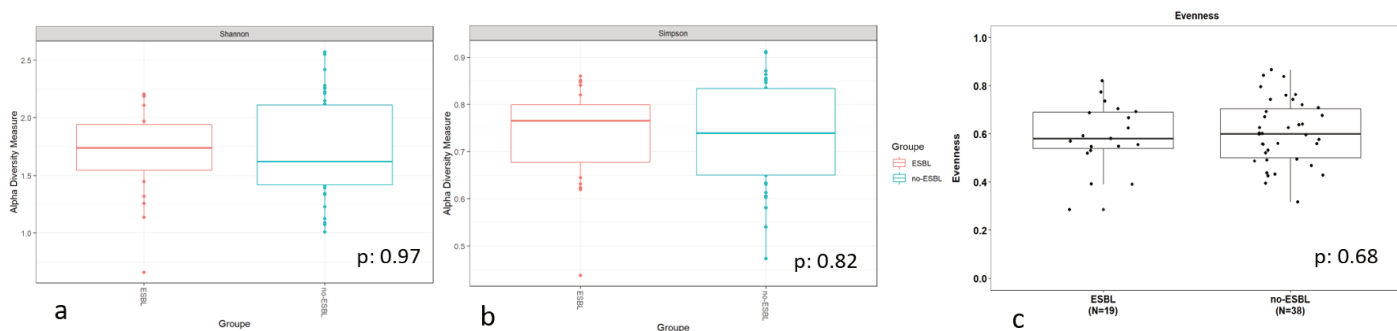


Figure 23 : Comparaison des diversités alpha des mycobiotes digestifs en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE. a : index de Shannon. b : index de Simpson. c : evenness. Rouge : patients colonisés au niveau digestif à E-BLSE. Bleu : patients non colonisés au niveau digestif à E-BLSE

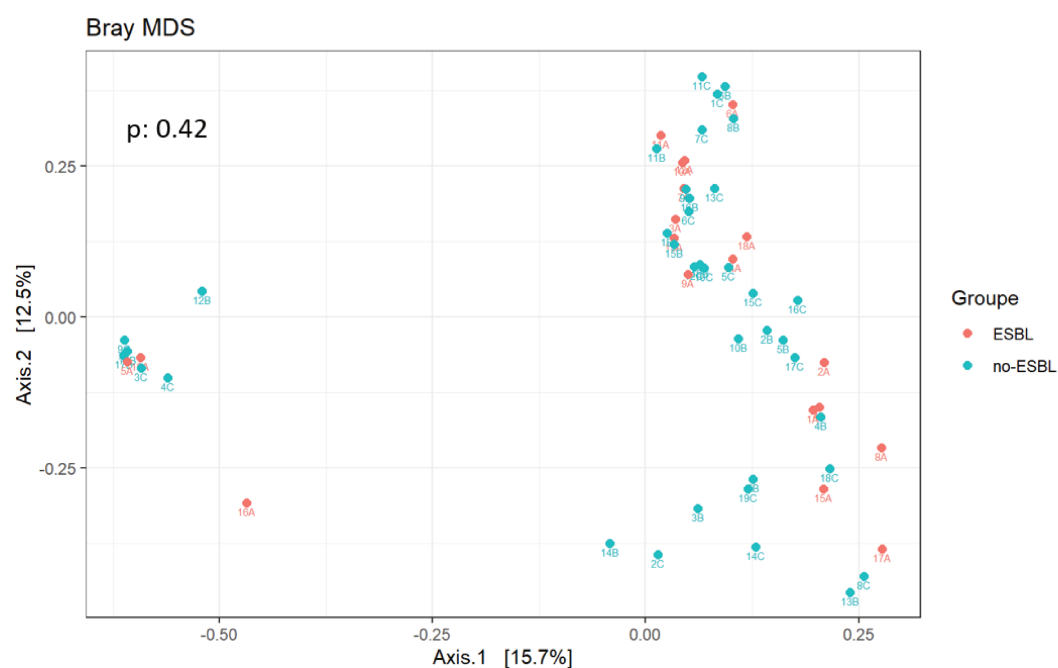


Figure 24 : Analyse de la diversité beta des mycobiotes digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction de la colonisation digestive par une E-BLSE. En rouge : patients colonisés à E-BLSE. En bleu : patients non colonisés à E-BLSE.

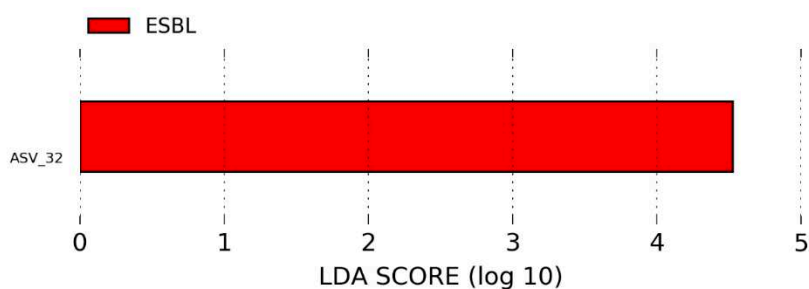


Figure 25 : Comparaison par analyse LefSe des ASV fongiques associés, au sein des mycobiotés digestifs, à la colonisation digestive par *E. coli* BLSE. ASV_32 : *Candida albicans*

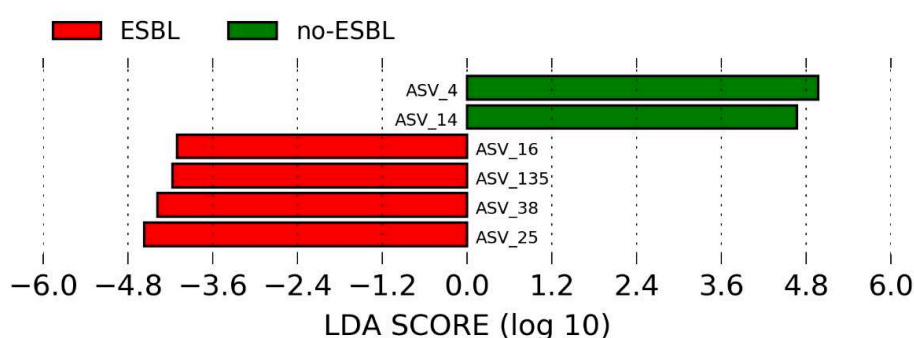


Figure 26 : Comparaison par analyse LefSe des ASV fongiques associés, au sein des mycobiotés digestifs, à la colonisation digestive par *K. pneumoniae* BLSE. ASV_4 et 14 : *Saccharomyces sp.* ASV_25 : *Issatchenkia orientalis* ASV_38 : *Candida tropicalis* ASV_135 : *Dipodascus geotrichum* ASV_16 : *Saccharomyces sp.*

Nous n'avons pas mis en évidence de différence de diversité alpha ou beta entre les mycobiotés des patients colonisés ou non colonisés par une E-BLSE, ni en comparant par espèce porteuse de BLSE. En raison de l'importance probable de l'espèce porteuse de la BLSE dans les interactions au sein du microbiote, nous avons malgré analysé les abondances relatives d'espèces fongiques en fonction de l'espèce BLSE colonisante.

Concernant la colonisation par *E. coli* BLSE, nous n'avons pas mis en évidence d'espèce associée à l'absence de colonisation mais *C. albicans* comme espèce associée à la colonisation.

Concernant la colonisation par *K. pneumoniae* BLSE, les champignons associés à l'absence de colonisation appartenaient au genre *Saccharomyces*, ceux associés à la colonisation étaient *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Dipodascus geotrichum* et un champignon du genre *Saccharomyces sp.*

4) Comparaison des microbiotes digestifs des patients **infectés** à E-BLSE par rapport à ceux **non infectés** à E-BLSE **parmi les patients colonisés** à E-BLSE

Parmi les 19 patients colonisés à E-BLSE, 4 ont été infectés par une E-BLSE au cours de leur séjour en réanimation (2 PAVM et 1 bactériémie d'origine urinaire à *E. coli* BLSE, 1 pyélonéphrite à *E. aerogenes* BLSE).

4.1. Comparaison des bactériotes

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative observée de diversité alpha selon les index de Shannon, Simpson et Evenness (respectivement $p = 0,26$; $p = 0,47$; $p = 0,47$) ni de diversité bêta (permanova, p ajusté = 0,12) entre les bactériotes des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE.

L'analyse par espèce n'était possible que pour *E. coli* BLSE car c'était la seule espèce pour laquelle il y avait plusieurs cas d'infection par la même espèce BLSE. Les diversités alpha des bactériotes des patients colonisés par *E. coli* BLSE infectés par *E. coli* BLSE semblaient plus faibles que celles des patients non infectés par *E. coli* BLSE, sans toutefois atteindre une différence statistiquement significative (selon les index de Shannon, Simpson et Evenness, respectivement $p = 0,13$; $p = 0,38$; $p = 0,28$) (Figure 27). De même, l'analyse de bêta diversité semblait différencier les bactériotes des patients infectés à *E. coli* BLSE de ceux non infectés à *E. coli* BLSE, sans être statistiquement significatif (permanova, p ajusté = 0,16) (Figure 28).

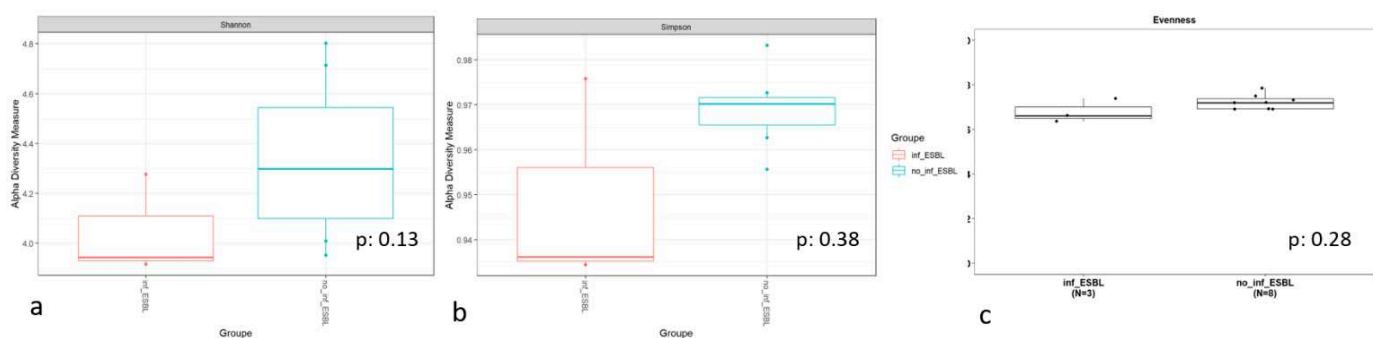


Figure 27 : Comparaison des diversités alpha des bactériotes digestifs en fonction du fait d'être infecté par *E. coli* BLSE en étant colonisé au niveau digestif par *E. coli* BLSE. a : index de Shannon. b : index de Simpson. c : evenness. Rouge : patients infectés par *E. coli* BLSE. Bleu : patients non infectés par *E. coli* BLSE.

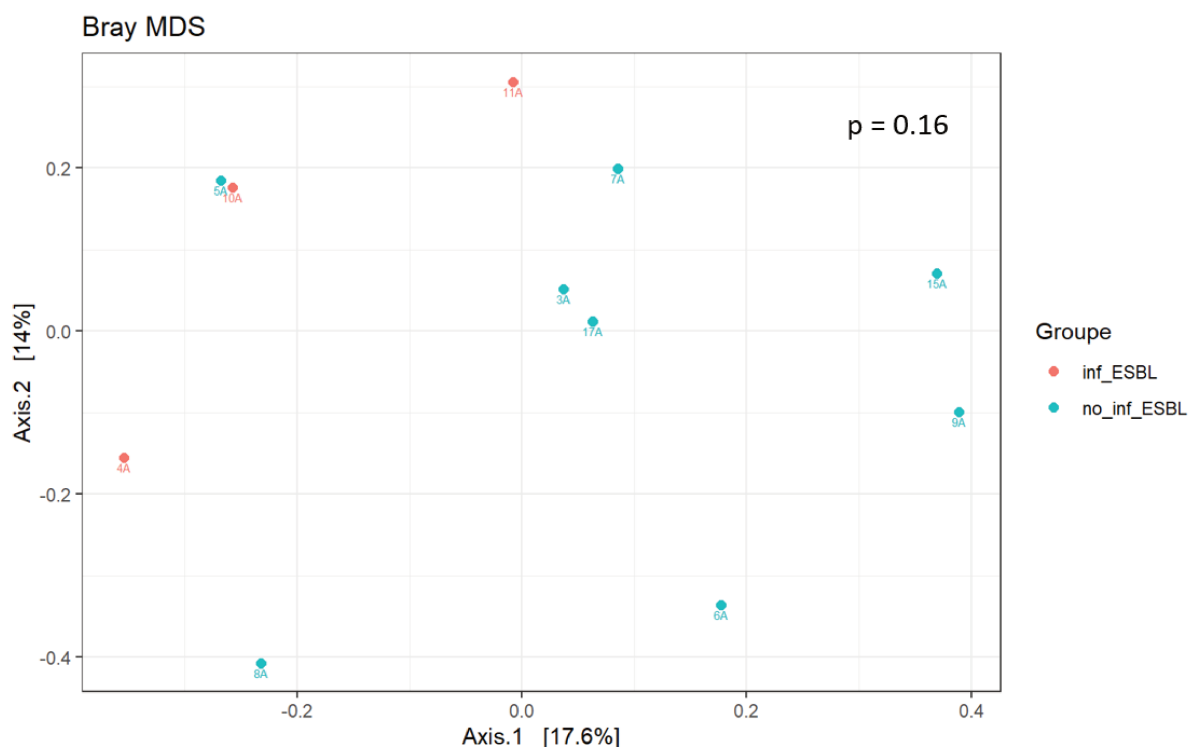


Figure 28 : Analyse de la diversité beta des bactériotes digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction du fait d'être infecté par *E. coli* BLSE en étant colonisé au niveau digestif par *E. coli* BLSE. En rouge : patients infectés par *E. coli* BLSE En bleu : patients non infectés par *E. coli* BLSE.

Un consortium de 4 bactéries (*Fingoldia magna* plus 3 appartenant à la famille *Clostridium* cluster XI : *Ezakiella sp.*, *Anaerococcus vaginalis* et *Peptoniphilus lacrimalis*) était associé à l'absence d'infection par E-BLSE (pas d'infection ou infection par une autre bactérie qu'une E-BLSE) (Figure 29).

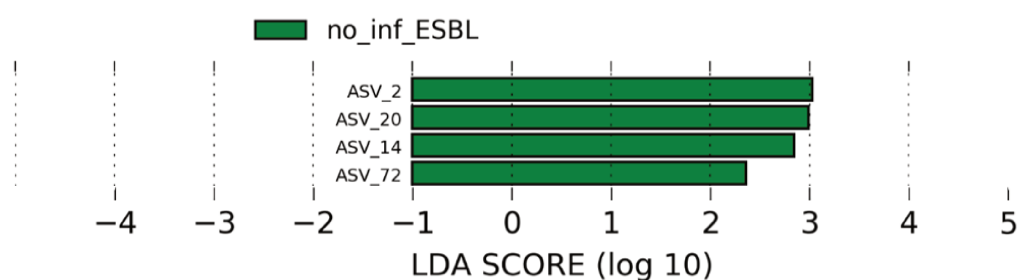


Figure 29 : Comparaison par analyse LefSe des des ASV bactériens associés, au sein des bactériotes digestifs, à la survenue d'infection par une E-BLSE chez les patients colonisés par une E-BLSE. ASV_2 : *Fingoldia magna*. ASV_20 : *Clostridium* cluster XI (*Ezakiella sp.*) ASV 14 : *Clostridium* cluster XI (*Anaerococcus vaginalis*). ASV 72 : *Clostridium* cluster XI (*Peptoniphilus lacrimalis*)

4.2. Comparaison des mycobiotés

Il existait une différence statistiquement significative observée de diversité alpha selon les index de Shannon, Simpson et Evenness (respectivement $p = 0,04$; $p = 0,048$; $p = 0,006$) (Figure 30) mais pas de diversité bêta (permanova, p ajusté = $0,08$) (Figure 31) entre les mycobiotés des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE.

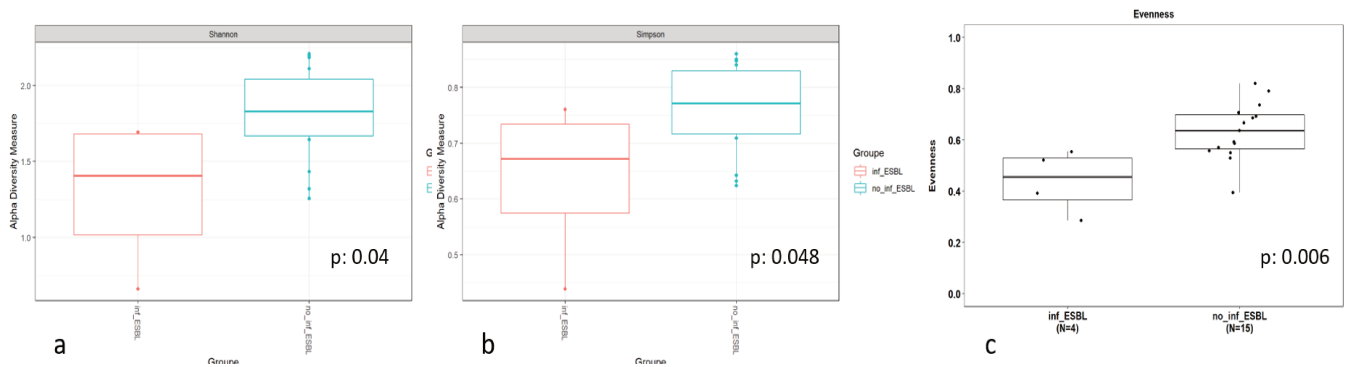


Figure 30 : Comparaison des diversités alpha des mycobiotés digestifs en fonction du fait d'être infecté par une E-BLSE en étant colonisé au niveau digestif par une E-BLSE. a : index de Shannon. b : index de Simpson. c : evenness. Rouge : patients infectés par une E-BLSE. Bleu : patients non infectés par une E-BLSE.

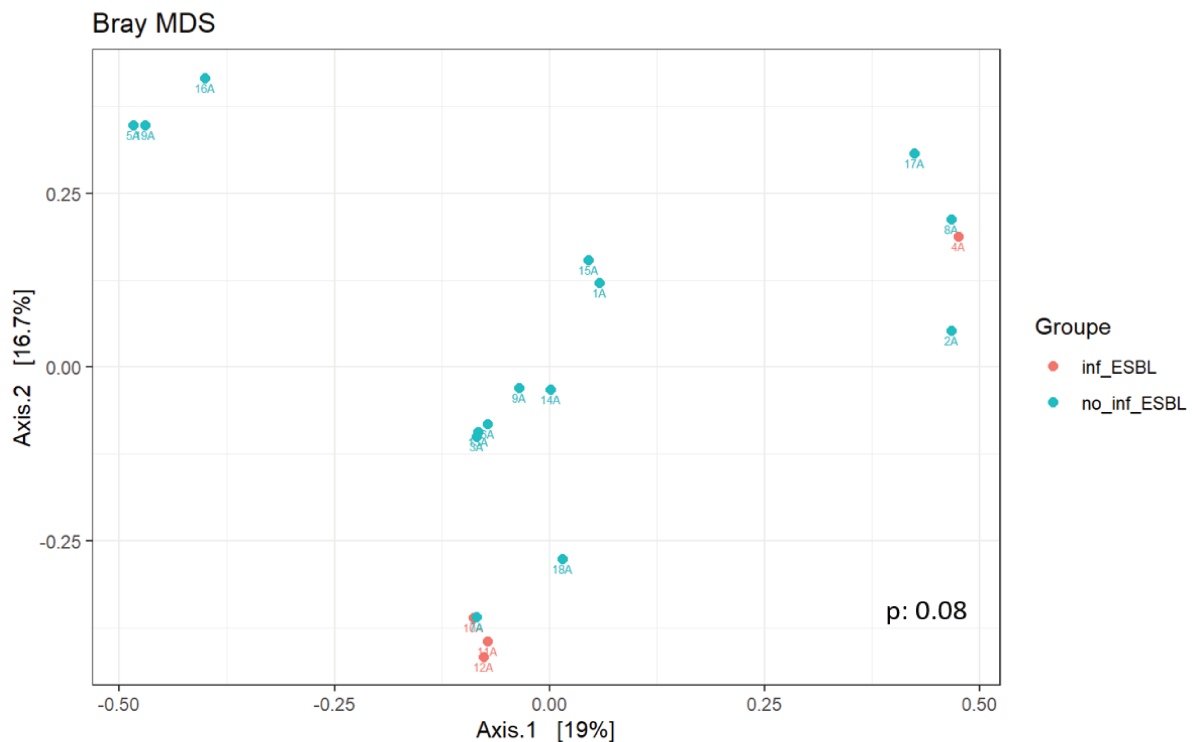


Figure 31 : Analyse de la diversité beta des mycobiotés digestifs par test métrique de Bray-Curtis en fonction du fait d'être infecté par une E-BLSE en étant colonisé au niveau digestif par une E-BLSE.

La présence de *Saccharomyces sp.* et en particulier *S. cerevisiae*, au sein du mycobiote digestif était associé au risque de survenue d'une infection à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE (Figure 32).

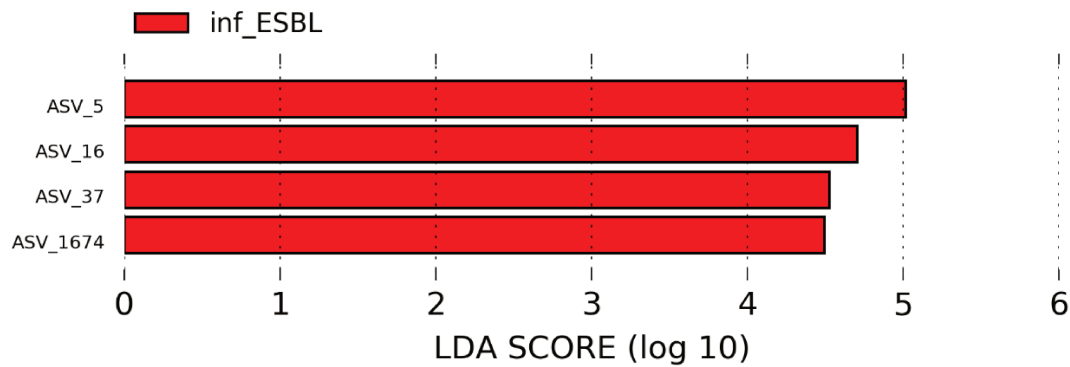


Figure 32 : Comparaison par analyse LefSe des des ASV fongiques associés, au sein des mycobiotes digestifs, à la survenue d'infection par une E-BLSE chez les patients colonisés par une E-BLSE. ASV_5, 16 et 37 : *Saccharomyces sp.* ASV_1674 : *Saccharomyces cerevisiae*.

La diversité alpha des mycobiotes des patients infectés par *E. coli* BLSE chez les colonisés par *E. coli* BLSE semblait plus faible que celle des mycobiotes des patients non infectés par *E. coli* BLSE sans atteindre le seuil de significativité statistique selon les index de Shannon, Simpson et Evenness (respectivement $p = 0,38$; $p = 0,28$; $p = 0,13$) (Figure 33).

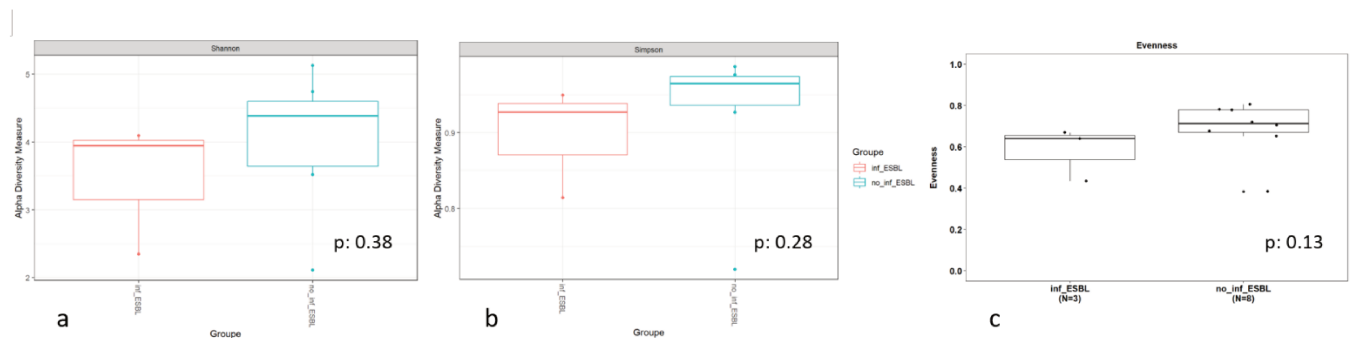


Figure 33 : Comparaison des diversités des bactériotes digestifs en fonction du fait d'être infecté par *E. coli* BLSE en étant colonisé au niveau digestif par *E. coli* BLSE. a : index de Shannon. b : index de Simpson. c : evenness. Rouge : patients infectés par *E. coli* BLSE. Bleu : patients non infectés par *E. coli* BLSE.

Discussion

1) Disséminations clonale et plasmidique des gènes codant pour les enzymes BLSE.

Les résultats en lien avec les premiers objectifs de cette thèse ont permis de confirmer que la dissémination clonale ne permet plus d'expliquer l'acquisition de colonisation digestive à E-BLSE sauf cas particulier. Cette avancée est le résultat de l'application de précautions d'hygiène rigoureuses, On constate également une association « préférentielle » de certains gènes codant pour des BLSE à certains plasmides sans pour autant constater une hégémonie d'un plasmide. Il est donc peu probable qu'une dissémination plasmidique permette, à elle seule, la dissémination des enzymes BLSE en réanimation.

Ces résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature ces dernières années. En effet, les études réalisées sur le sujet après 2010 retrouvent des taux d'acquisition de colonisation digestive à E-BLSE de 4 à 12%. Dans ces travaux, très peu d'acquisitions sont expliquées par des transmissions croisées (299–302). Notre étude est justifiée par le fait qu'elle a été débutée alors que les 3 articles les plus récents parmi les 4 cités n'étaient pas encore publiés et cherchait à répondre à une question clinique prégnante. De plus, deux de ces articles, n'utilisant pas la méthode de PFGE, sont moins discriminants que notre étude et pourraient donc surestimer le rôle de la transmission croisée.

Concernant la dissémination plasmidique, nous retrouvons dans notre étude les plasmides classiquement décrits associés aux gènes de résistances codant pour les enzymes BLSE (50,69). Nous ne retrouvons pas de plasmide hégémonique expliquant à lui seul la dissémination des BLSE. **Malheureusement, nous avons un nombre non négligeable de plasmides dont le groupe d'incompatibilité n'a pas pu être déterminé.** Les témoins positifs n'étant pas disponibles pour tous les groupes d'incompatibilité plasmidique malgré des demandes répétées aux équipes européennes spécialistes du sujet (Luisa Peixe, Université de Porto, Portugal et Alessandra Carattoli, Université Sapienza de Rome, Italie), nous ne pouvons pas savoir si ce sont les PCR qui ont été prises en défaut ou si des plasmides d'autres groupes d'incompatibilité co-existent. Devant les limites budgétaires du laboratoire, nous n'avons pas pu réaliser le séquençage de tous les plasmides n'ayant pas de groupe d'incompatibilité déterminé.

La principale limite de notre étude est le fait que 13 souches ont été perdues ou n'ont pas pu être cultivées après congélation. Cependant, seules 3 concernaient un cas de colonisation acquise en réanimation et dans un de ces 3 cas, il s'agissait d'un *Citrobacter freundii* alors qu'aucun autre patient n'était porteur de cette bactérie BLSE. Enfin, le dépistage de la

colonisation par E-BLSE nécessite la réalisation correcte de l'écouvillon ce qui ne semble malheureusement pas toujours le cas et ce qui peut amener à sous-estimer le pourcentage de patients colonisés que ce soit par importation ou acquisition.

Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives. En effet, si l'acquisition des E-BLSE ne s'explique pas uniquement par les disséminations plasmidique et clonale, il faut envisager un autre mécanisme. A l'inverse des résistances aux antibiotiques survenant *de novo* par mutation de quelques nucléotides, il ne peut y avoir d'émergence *ex nihilo* de plasmide porteur de gènes codant pour des BLSE. Une hypothèse pourrait être l'acquisition d'un clone E-BLSE lors d'une hospitalisation précédente ou dans la communauté dont la croissance serait contrôlée par les autres micro-organismes présents dans le tube digestif, à savoir le microbiote. A l'occasion d'un changement d'état de l'hôte (comme lors d'un séjour en réanimation) et/ou des différentes antibiothérapies, le microbiote serait profondément remodelé et ces changements pourraient entraîner un défaut de contrôle du clone E-BLSE qui pourrait donc s'expandre. Cette expansion pourrait alors le rendre détectable par les méthodes classiques de dépistage du portage de E-BLSE et la croissance de l'inoculum pourrait augmenter la contamination de l'environnement et augmenter le risque de propagation. Cela souligne l'importance du maintien de précautions d'hygiène rigoureuses mais indique également que ces procédures ne suffisent pas à enrayer l'acquisition d'E-BLSE. L'étude du rôle du microbiote dans la colonisation par E-BLSE a été le deuxième axe de cette thèse et les résultats sont décrits ci-après.

2) Lien colonisation-infection chez les patients colonisés à E-BLSE

Concernant le lien entre colonisation digestive à E-BLSE et le risque d'infection à E-BLSE, nous trouvons un faible nombre d'infections à E-BLSE parmi les porteurs. En effet, sur les 55 patients colonisés au niveau digestif à E-BLSE, 38 ont eu une infection et, dans seulement 6 de ces 38 (16%) cas, la bactérie responsable de l'infection était une E-BLSE. Ces résultats sont également en accord avec les données de la littérature puisqu'une autre étude avait déterminé que 10% des premiers épisodes d'infection acquise en réanimation et 27% des deuxièmes épisodes étaient dus à une E-BLSE chez les patients colonisés (160). Ces résultats ne nient pas le fait que la colonisation digestive à E-BLSE soit un facteur de risque d'infection à E-BLSE mais rappelle que la grande majorité des infections, même chez ces patients colonisés, est causée par une autre bactérie qu'une E-BLSE (162,163). Nous trouvons dans notre travail une VPP de 40% et une VPN de 100% du fait d'être colonisé au niveau digestif par une E-BLSE pour l'implication d'une E-BLSE dans la survenue d'une PAVM. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats de la littérature pour la colonisation pulmonaire comme digestive à E-BLSE (161,164,166). En revanche, notre étude prouve pour la 1^{ère} fois, dans le cas des E-BLSE, que le clone E-BLSE colonisant est bien celui responsable de la PAVM lorsque celle-ci est causée par une E-BLSE. Devant cette excellente VPN, il a été suggéré que la connaissance du statut de colonisation digestive à E-BLSE pourrait permettre de guider l'antibiothérapie probabiliste en cas d'infection chez un patient porteur. Malheureusement, des données récentes de la littérature suggèrent que la connaissance de ce statut entraîne plutôt une surconsommation des carbapénèmes et que l'arrêt de ce dépistage permettrait de diminuer la consommation de carbapénèmes sans retentissement défavorable sur les patients (161,171). Si la colonisation digestive à E-BLSE est un facteur de risque d'infection à E-BLSE, il demeure impossible, à ce jour, de prédire individuellement qui sera infecté par une E-BLSE ou par une autre bactérie chez les patients colonisés. Tous ces éléments de discussion ont été abordés dans la revue systématique publiée dans *Critical care*. Malheureusement, comme pour les souches colonisantes, certaines souches infectantes étaient manquantes et nous ne pouvons pas être sûr que toutes les infections à E-BLSE chez les patients colonisés étaient bien causées par le clone colonisant.

Dans l'hypothèse d'une augmentation de l'importance de l'inoculum E-BLSE comme proposé à la fin du paragraphe précédent, l'augmentation de la masse de bactérie E-BLSE pourrait également augmenter la probabilité de translocation de ce clone résistant à un autre organe, augmentant ainsi le risque d'infection par cette E-BLSE. L'étude du rôle des microbiotes

digestif et pulmonaire dans la survenue d'une infection à E-BLSE chez les patients porteurs serait donc un axe intéressant.

Nous avons souhaité, dans un premier temps, essayer de déterminer des facteurs de risque individuels d'infection à E-BLSE chez les patients colonisés. Un chef de clinique-assistant du service de Médecine Intensive Réanimation de l'hôpital Pellegrin est en train de comparer de façon rétrospective les patients porteurs d'E-BLSE infectés par une E-BLSE à ceux non-infectés ou infectés par une autre bactérie. Ces travaux constitueront son mémoire de Diplôme d'Etudes Spécialisées Complémentaires. Malheureusement, ce travail est rétrospectif et nous ne pourrions pas estimer la taille de l'inoculum par qPCR pour essayer de confirmer que son expansion augmente bien le risque d'infection par E-BLSE.

Comme discuté dans l'introduction, l'antibiothérapie la plus adaptée en cas d'infection survenant chez ces patients colonisés à E-BLSE est sujet à débat. Au vu des données décrites précédemment, il apparaît logique de s'interroger pour savoir s'il ne serait pas possible d'épargner l'utilisation de carbapénèmes lors de l'antibiothérapie probabiliste des PAVM survenant chez les patients colonisés au niveau digestif par des E-BLSE en utilisant d'autres molécules. Une étude rétrospective ne retrouvait pas de différence en terme de durée de ventilation mécanique, de durée de séjour en réanimation ni de taux de mortalité (55.8% vs 50%, $p = 0.48$) entre les PAVM à E-BLSE comparées aux PAVM non à E-BLSE (166). Les études rétrospectives ayant étudié l'impact du traitement probabiliste dans les bactériémies à E-BLSE ne retrouvent pas non plus d'augmentation de la mortalité (167–169). Le pronostic de ces infections était essentiellement déterminé par des facteurs liés à l'hôte ce qui reflète que le portage d'une E-BLSE est probablement le reflet d'une fragilité de l'hôte (170). Nous avons obtenu un financement pour une étude exploratoire analysant l'inocuité d'une stratégie utilisant la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez les patients colonisés à E-BLSE non en choc septique (en Annexe n°4 pages 179-216).

Outre l'étude du lien entre colonisation et infection à E-BLSE sur le plan des facteurs de risque et de prédiction cliniques, l'exploration des mécanismes sous-tendant ce lien sont également des voies prometteuses.

Il pourrait être intéressant d'établir les cartographies plasmidiques des différents plasmides isolés dans les E-BLSE. En effet, les facteurs de virulence qu'ils portent et/ou le coût énergétique qu'ils imposent à la bactérie hôte peuvent grandement moduler ses capacités de

réplication et d'invasion. Ils pourraient avoir un rôle non négligeable dans la capacité de la bactérie à causer une infection.

Par ailleurs, ces E-BLSE sont en compétition avec les autres micro-organismes du tube digestif et le microbiote intestinal peut donc influencer sur leur pouvoir infectant.

3) Comparaison des microbiotes digestifs des patients **colonisés** à E-BLSE à ceux **non colonisés** à E-BLSE

L'absence de différence de diversité alpha et bêta entre les bactériotes des patients colonisés à E-BLSE et ceux non colonisés rejoint les résultats des travaux précédents de Piewngam *et al.* (267) et Fontaine *et al.* (e-poster P182, congrès de la Société de Réanimation de Langue Française 2019).

Les différences de diversité alpha des bactériotes entre les patients colonisés par *E. coli* BLSE et *K. pneumoniae* BLSE soulignent l'importance d'étudier les interactions entre espèces en ne se limitant pas au portage de tel type de résistance. Pour l'instant, aucune étude concernant la colonisation par des bactéries BLSE n'a eu ce niveau d'analyse.

Au-delà de la diversité, qui offre un survol de l'analyse des microbiotes, une espèce bactérienne était associée à la colonisation à *E. coli* BLSE. De façon intéressante, *Sellimonas intestinalis* n'a été décrite qu'en 2016 et beaucoup reste à découvrir quant à cette bactérie (303). Elle a déjà été retrouvée dans le bactériote digestif de patients hospitalisés en réanimation et semble résistante au métronidazole et à l'imipénème (304). De façon intéressante, cette bactérie appartient au genre *Clostridium* cluster XIVa connu pour produire du butyrate modifiant le pH de l'environnement et des bactériocines (305). Il serait intéressant de réaliser des co-cultures *S. intestinalis* (ou de son surnageant) et *E. coli* à la recherche d'une inhibition de la croissance d'*E. coli* ou de la donner en probiotique à une souris au microbiote humanisé colonisé par *E. coli* BLSE.

Concernant le rôle du consortium associé à l'absence de colonisation par *K. pneumoniae*, le rôle des différentes bactéries identifiées reste à déterminer. Leurs interactions respectives avec *K. pneumoniae* ont été très peu étudiées. Il semblerait que les bactéries du genre *Campylobacter* soient antagonistes de *K. pneumoniae* puisque les poulets colonisés par *C. jejuni* ont été montrés comme ayant moins de *K. pneumoniae* au niveau iléal et cécum que des poulets non colonisés (306). *K. pneumoniae* semble d'ailleurs également capable de « combattre » *C. jejuni* par la production de métabolites (307,308). Enfin, des associations diverses entre *Dialister*, *Prevotella* et *Klebsiella* ont été décrites dans la littérature s'intéressant au rôle du microbiote en psychiatrie sans qu'il soit possible d'en tirer d'information précise sur leurs capacités d'interaction (309).

De façon rassurante, les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae* étaient à chaque fois associées aux bactériotes des patients colonisés par ces espèces BLSE lors des analyses d'association par LefSe validant le modèle d'analyse.

A notre connaissance, notre étude est la première ayant étudié le mycobiote intestinal chez les patients en réanimation, et en lien avec la colonisation par des bactéries résistantes.

C. albicans est connu pour interagir avec *E. coli*. En effet, la présence d'*E. coli* diminue la formation de biofilm par *C. albicans* et *E. coli* est capable de sécréter un composant fongicide soluble actif sur *C. albicans* de façon dépendante du magnésium (310–312). Inversement, les composants de la paroi de *C. albicans* sont capables d'augmenter la résistance d'*E. coli* à l'ofloxacine au sein du biofilm polymicrobien créé (279). Notre équipe a également montré qu'une souche *E. coli* BLSE était capable de « planter » des *pili* directement dans *C. albicans* permettant des échanges de nutriments (données non publiées). Enfin, le mannose et les mannanes composant la paroi de *C. albicans* semblent inhiber la phagocytose par les macrophages d'*E. coli* (313).

Concernant la colonisation digestive par *K. pneumoniae* BLSE, tous les *Saccharomyces sp.* ne semblent pas interagir de la même façon avec *K. pneumoniae* et l'étude des capacités d'inhibition ou de synergie des différentes espèces pourrait être intéressante. Ainsi, le surnageant d'une culture de *S. boulardi* semble diminuer le métabolisme et donc la croissance de *K. pneumoniae* (314). *S. cerevisiae* pourrait, lui, stimuler la prolifération de *K. pneumoniae* via la production d'acide 3-hydroxypropionique (315) ou via la production de quinone pyrroloquinoline (316). A l'inverse, *S. cerevisiae* semble stimuler la réponse phagocytaire dans un modèle murin de sepsis à *K. pneumoniae* (317). Ces études prouvent qu'ils existent des interactions entre les *Saccharomyces sp.* et *K. pneumoniae* mais celles-ci nécessitent d'être vérifiées par des études plus rigoureuses et analysant les capacités d'interaction de chaque espèce individuellement.

L'étude des interactions inter-règles, champignons-bactéries, virus-bactéries et champignons-virus, en plus des interactions intra-règles en est encore à ses balbutiements mais sera probablement porteuse de nombreuses découvertes. L'analyse du virome à la recherche de bactériophages présents chez les patients non colonisés par telle ou telle espèce BLSE est une piste enthousiasmante mais qui se heurte à nombre de difficultés techniques même si des avancées récentes ouvrent la porte à son développement (318).

4) Comparaison des microbiotes digestifs des patients **infectés** à E-BLSE par rapport à ceux **non infectés** à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE

Nous n'avons pas mis en évidence de différence de diversité alpha ni bêta entre les bactériotes des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non-infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE. Néanmoins, nous avons relativement peu de patients colonisés à E-BLSE (19) avec seulement 4 patients infectés à E-BLSE et les analyses statistiques ont manqué de puissance. L'analyse ciblée sur les infections par *E. coli* BLSE chez les patients colonisés à *E. coli* BLSE se heurte au même problème du manque de puissance en raison du faible nombre de patients (3 vs 8). Il est primordial de confirmer (ou d'infirmer) les tendances observées sur des effectifs bien plus large.

Nous avons, en revanche, mis en évidence une différence significative de diversité alpha entre les mycobiotes des patients infectés à E-BLSE par rapport à ceux non-infectés à E-BLSE parmi les patients colonisés à E-BLSE. Ce résultat souligne l'intérêt d'étudier le mycobiote et le virobiote en parallèle du bactériote comme discuté précédemment. L'absence de différence de diversité bêta est probablement due à un manque de puissance. Là encore, le trop faible nombre de patients infectés par *E. coli* BLSE limite la puissance de l'analyse.

Le consortium de bactéries associées à l'absence d'infection à *E. coli* BLSE doit être confirmé sur un plus grand nombre de patients mais l'appartenance de ces bactéries aux *Clostridium* cluster XI en fait de bonnes candidates car elles sont susceptibles de produire divers métabolites et des bactériocines. Leurs interactions avec *E. coli* demandent à être étudiées *in vitro*. L'analyse LefSe n'a pas retrouvé d'ASV fongique discriminante entre les patients infectés par *E. coli* BLSE et ceux non infectés par *E. coli* BLSE, également probablement par manque de puissance. Lors de l'analyse des patients infectés par E-BLSE en comparaison à ceux non infectés par une E-BLSE, les ASV discriminantes correspondaient à des champignons du genre *Saccharomyces sp.*, et en particulier *S. cerevisiae*. Cette association doit être confirmée sur un plus grand nombre de patients mais les interactions entre *Saccharomyces sp.* et entérobactéries sont plus que probables comme discuté précédemment.

De façon générale, ces résultats suggèrent une influence du microbiote (bactériote et mycote) intestinal sur la colonisation par les E-BLSE avec des perturbations différentes en fonction de l'espèce porteuse de BLSE colonisante.

L'identification de bactéries et de champignons associés à l'absence de colonisation par *E. coli* ou *K. pneumoniae* BLSE encourage à étudier les interactions inter-espèces *in vitro* afin de disséquer les mécanismes d'interaction. Si ces études confirment des interactions entre les espèces BLSE et ces espèces bactériennes ou fongiques, la confirmation d'une relation causale et non d'association se fera par modulation du microbiote digestif, grâce à ces bactéries ou champignons identifiés, d'un modèle porcin, ou murin à microbiote humanisé, de colonisation à E-BLSE. Un essai d'éradication du portage d'E-BLSE par des probiotiques « sur-mesure » serait ensuite envisageable chez l'Homme.

En dépit d'un manque de puissance en raison du trop faible nombre d'évènements, le microbiote intestinal (bactériote comme mycote) semble associé à la survenue ou non d'une infection par une E-BLSE chez les patients colonisés par E-BLSE.

Ces hypothèses demandent à être vérifiées sur de plus larges cohortes de patients afin d'augmenter leur validité. L'avantage d'avoir réalisé l'assignation suivant le *pipe-line* DADA2 est de pouvoir comparer, sous réserve d'utiliser des amorces similaires, les résultats entre les différentes études.

Cette approche s'est révélée fructueuse dans le cas de la colonisation par ERV comme décrit précédemment. Ainsi l'équipe new-yorkaise d'Eric Pamer a pu identifier un consortium de 4 bactéries permettant d'éradiquer le portage digestif d'ERV avec une de ces bactéries, *Blautia producta*, produisant une bactériocine de la famille des lantibiotiques active contre l'ERV (277,319).

Enfin, si des interactions bactéries-bactéries et bactéries-champignons existent, il ne faut pas oublier le rôle potentiellement majeur des interactions bactéries-virus et champignons-virus, les bactériophages étant les principaux régulateurs de biomasse sur Terre (285). L'étude du virobiote se heurte encore à de nombreuses limites techniques décrites précédemment mais son développement sera assurément une source de progrès majeur dans les années à venir.

5) Etude du microbiote : limites générales

Les méthodes d'étude du bactériote et du mycote ne sont pas encore standardisées ce qui limite la validité externe des résultats et les possibilités de confrontation critique des résultats obtenus par différentes équipes. L'exploration du virote n'en est qu'à son balbutiement. L'interprétation des résultats tant sur le plan statistique que biologique est encore incertaine. De plus, la majorité des études apporte une information sur la corrélation entre le microbiote et un état pathologique sans aborder la causalité. Toutes les méthodes ayant des forces et des faiblesses, il convient de définir avec soin la question d'étude et les hypothèses de travail pour choisir les méthodes les plus robustes pour y répondre. Les pages suivantes ont pour objectif de souligner les étapes cruciales à l'élaboration d'une étude du microbiote.

5.1. Limites techniques de l'étude du microbiote

La première étape, comme pour toute recherche biomédicale, est de choisir un groupe homogène de patients afin de réduire au maximum les biais confondants possibles. En raison du nombre de facteurs influençant la composition du microbiote, il est difficile de tous les prendre en compte mais il est important de porter attention au sexe, à l'âge, à l'alimentation et au style de vie. Il est également primordial de caractériser rigoureusement la pathologie étudiée. Les patients de réanimation concentrent un grand nombre de facteurs influençant la composition du microbiote. Il importe donc de soigneusement définir la population à étudier en fonction de la question posée.

La deuxième étape doit permettre que l'ADN préparé pour le séquençage soit bien le reflet du microbiote que l'on souhaite étudier. Il est primordial d'avoir un processus de recueil strictement identique pour tous les prélèvements (selles ou écouvillons ou biopsies pour le microbiote digestif, crachats ou aspiration trachéale ou lavage broncho-alvéolaire pour le microbiote pulmonaire). En fonction de la question posée, le type de microbiote prélevé peut être amené à varier. Ainsi, une étude sur le rôle de modulation immunitaire du microbiote digestif peut parfois nécessiter l'étude du microbiote muqueux au niveau des plaques de Peyer, difficile d'accès, quand l'étude du microbiote en rapport avec le portage digestif de bactéries résistantes aux antibiotiques pourra se contenter du microbiote luminal colique ou rectal (320). Les méthodes d'extraction, maintenant souvent des kits industriels standardisés, vont également impacter les résultats obtenus. Ainsi la lyse mécanique doit être ajoutée à celle chimique afin d'optimiser l'obtention du matériel génétique représentatif du microbiome. Cette lyse

mécanique permet d'obtenir l'ADN des bactéries à Gram positif en quantité représentative de leur importance (321,322). De plus, l'ajout d'inhibiteur de PCR aide à la qualité des résultats. Les conditions de transport et de stockage avant extraction sont également des éléments clés à réfléchir avant d'entreprendre l'étude du microbiote (323,324).

La troisième étape permet de séquencer l'ADN présent et, encore une fois, le but est que les séquences obtenues traduisent le plus fidèlement possible la composition de l'ADN extrait et donc celle du microbiote étudié. Pour séquencer ces gènes d'intérêt, une réaction de PCR avec des amorces ciblant la région voulue de ce gène d'intérêt est réalisée. Cette région doit être hautement variable afin de permettre une identification précise grâce au séquençage mais être encadrée par des régions extrêmement conservées pour permettre aux amorces de PCR de s'y fixer avec une affinité proche entre les différentes espèces (325). L'étude du compartiment bactérien du microbiote repose essentiellement sur le séquençage de l'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ADN16S) pour plusieurs raisons en plus de son coût avantageux. Cette région est très conservée entre bactéries avec néanmoins des régions hypervariables permettant une assignation à différents niveaux taxonomiques, elle diffère du gène eucaryote homologue (18S) ce qui évite l'amplification d'ADN de l'hôte, les banques de données pour identification des séquences obtenues sont très développées et les résultats par cette technique sont proches de ceux obtenus par analyse du séquençage du génome entier. L'ADN 16S est préféré à l'ADN 23S, 5S ou à d'autres gènes bactériens en raison du compromis entre la taille du gène (1,5kb pour l'ADN 16S soit 400b environ pour le fragment V3-V4) et la quantité d'information disponible. La relative petite taille des fragments peut parfois limiter les capacités d'assignation taxonomique. La composition attendue du microbiote au sein du prélèvement peut influencer sur le choix du gène ou de la région d'intérêt. Il est ainsi classique de préférer le séquençage de la région V5 pour un microbiote environnemental. L'étude du mycobiote peut utiliser les régions ITS1 ou ITS2 (internal transcribed spacers) ou l'ARNr18S sans qu'un gène d'intérêt n'ait montré une franche supériorité entre ITS2 et ARNr18S (326). Cette technique de séquençage d'un gène d'intérêt a donc l'avantage d'être rapide, simple, peu chère, d'obtenir des résultats proches de ceux obtenus par séquençage du contenu génomique total, de permettre l'étude d'échantillons contenant peu de biomasse ou fortement contaminés et enfin de permettre une analyse semi-quantitative relative. Cependant, plusieurs écueils existent. Cette technique ne permet pas la distinction entre bactéries vivantes et mortes ni entre bactéries métaboliquement actives ou non, l'amplification par PCR génère un biais variable en fonction de la région d'intérêt et des amorces utilisées, elle nécessite une estimation *a priori* de

la composition de la communauté microbienne, la résolution est rarement supérieure au genre en raison de la petite taille des fragments amplifiés, elle nécessite des contrôles négatifs car les contaminants des réactifs sont également amplifiés, il n'est pas possible de réaliser une quantification absolue. Comparativement au séquençage de l'ADN 16S, le séquençage de l'ADN total évalue de façon à peu près semblable la composition du microbiote en étant toutefois exempt des biais d'amplification lors de la PCR ciblée sur le gène d'intérêt, il peut évaluer directement l'abondance relative des gènes fonctionnels et, enfin, il permet l'assemblage de génomes bactériens. Il reste cependant cher et l'analyse bioinformatique des données obtenues est complexe, la contamination par l'ADN de l'hôte et des organelles peut masquer les signatures microbiennes, les plasmides ne sont pas correctement annotés et il n'y a pas, non plus, de distinction entre organismes morts et vivants.

Le séquenceur utilisé impacte également la qualité des séquences. Les séquenceurs de la gamme Illumina® se sont aujourd'hui imposés pour le séquençage ciblé grâce au MiSeq. Concernant le séquençage de l'ADN total, les séquenceurs possibles sont le HiSeq d'Illumina®, les séquenceurs de la compagnie Pacific BioSciences ou encore les puces à Nanopore d'Oxford Nanopore Technologies. Pour l'instant, le séquenceur le plus « fidèle » est le HiSeq Illumina mais les 2 autres séquenceurs sont bien plus rapides et permettent d'obtenir des séquences de plus grande taille (327–329).

La quatrième étape est celle de bioinformatique qui doit, toujours le plus fidèlement possible, déterminer quels micro-organismes sont présents dans le microbiote étudié à partir des séquences obtenues.

Les données issues du séquençage sont représentées par des dizaines ou des centaines de milliers d'amplicon. La première étape consiste à éliminer les séquences des amorces et des adaptateurs puis à créer des « contigs » ce qui consiste à assembler les amplicons des 2 sens de lecture par séquences complémentaires. Les séquences de longueurs aberrantes ne correspondant pas à la longueur de la région ciblée du gène d'intérêt sont ensuite éliminées ainsi que celles ayant un trop grand nombre de bases ambiguës. Toutes les séquences ne correspondant pas à la région du gène d'intérêt sont éliminées pour la suite de l'analyse. La dernière étape consiste à enlever les séquences chimériques, fruits d'hybridations aberrantes lors de l'étape de PCR. Toute la limite de cette étape de nettoyage des données est d'enlever le maximum de bruit de fond lié aux imperfections des techniques utilisées tout en conservant le maximum d'information.

Les séquences identiques sont ensuite regroupées pour accélérer la suite de l'analyse sauf pour certains *pipe-lines* d'analyse comme DADA2. Ce regroupement est censé faire gagner du temps d'analyse mais limite la comparabilité des résultats obtenus entre chaque analyse. Le *pipe-line* DADA2, en utilisant des « exact sequence variants », s'affranchit de cette limite et devrait permettre de pouvoir comparer les résultats entre équipe à la condition que les conditions de prélèvement, recueil, extraction, stockage aient été identiques et que l'étude ait porté sur la même région du gène d'intérêt (297,298).

En cas de choix d'assignation taxonomique par unités taxonomiques fonctionnelles ou OTUs, les séquences ayant 1% ou moins de différence sont considérées identiques car le taux de fidélité des PCR et séquençage est estimé à 99%. Les OTUS sont déterminées le plus souvent selon un seuil de 97% d'homologie de séquence. Le choix de la méthode utilisée peut faire varier sensiblement les résultats de l'assignation taxonomique. Son choix dépend de la région ciblée et du type d'échantillon de départ (330,331).

Enfin, après obtention de la composition du microbiote la plus fidèle possible malgré toutes ces limites, l'analyse statistique de données issues du séquençage essaie d'aider à dégager un sens biologique. Tous les tests statistiques utilisés doivent être considérés comme des tests multiples. Les diversités alpha et bêta permettent une première approche générale des données de séquençage. La diversité alpha représente la diversité d'espèces (le nombre d'espèces) au sein d'un échantillon. Cette donnée est purement quantitative, deux microbiotes n'ayant aucune espèce en commun mais le même nombre d'espèces peuvent avoir la même diversité alpha. Les mesures de diversité alpha ne mesurant que la richesse (comme Chao1) sont sensibles au nombre de séquences par échantillon alors que les mesures combinant richesse et uniformité (comme l'index de Shannon) le sont beaucoup moins. Ces méthodes sont validées pour l'analyse de l'ARNr16S et sont utilisées, par extension, pour l'analyse du mycobiote par l'analyse de l'ARNr18S, d'ITS1 ou ITS2.

La diversité bêta compare la similitude entre les échantillons en comparant chaque paire d'échantillons et en générant une distance matricielle entre ces paires. Les mesures quantitatives (Bray-Curtis, Canberra et UniFrac pondéré) prennent en compte l'abondance relative des taxa dans leurs calculs alors que les mesures qualitatives (Jaccard binaire et UniFrac non pondéré) ne prennent en compte que l'absence ou la présence des taxa. Les résultats de distances matricielles sont souvent assez hermétiques à première vue et leur visualisation est facilitée par des techniques d'ordination telles que l'analyse de coordonnées principales (PCoA) ou l'analyse en composant principal (PCA). Ces techniques permettent de représenter

graphiquement ces distances matricielles selon 2 ou 3 dimensions. Les points correspondant à chaque échantillon peuvent ensuite être colorés en fonction des métadonnées afin de visualiser des regroupements de points appelés *clusters*.

L'analyse DeSeq2 utilise une hypothèse de distribution binomiale négative pour estimer la variation de la variance en intégrant ou non chaque ASV ou OTU afin d'estimer le poids de chaque ASV ou OTU dans la distribution en deux groupes biologiques préalablement définis (332).

L'analyse par linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) est une méthode permettant des comparaisons de classes de haute-dimension (333). Elle identifie dans un premier temps les ASV ou OTU présentant des différences significatives entre les échantillons par test de Kruskal-Wallis puis identifie dans un second temps les ASV ou OTU présentant une différence de répartition entre deux (ou plus) groupes d'intérêt biologique par test de Wilcoxon. Enfin, la LDA permet d'estimer la force de l'association de l'ASV ou OTU à tel groupe biologique.

5.2. Limites conceptuelles de l'étude du microbiote

5.2.1. Présence ou fonction ?

Comme décrit précédemment, au-delà des difficultés techniques pour s'assurer que la communauté microbienne identifiée est bien le reflet de celle présente au sein de l'hôte, l'interprétation des données reste difficile. En effet, il n'est pas possible, à l'heure actuelle d'avoir une identification fiable d'espèce et encore moins de souche. Cela est éminemment limitant car il est bien connu en bactériologie que différentes souches de *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, par exemple, n'ont pas du tout le même impact sur l'Homme ni les mêmes interactions inter-espèces au sein d'une communauté microbienne. Il est donc difficile à partir de ces déterminations du microbiote d'analyser le rôle fonctionnel ou métabolique des micro-organismes présents. De nouvelles approches ont émergé pour essayer de répondre à ce problème.

L'analyse métatranscriptomique repose sur le séquençage de l'ARN qui a plusieurs avantages : il permet d'évaluer non pas les gènes présents mais les gènes transcrits et donc potentiellement actifs. Il permet donc, s'il est couplé à une analyse par gène d'intérêt, de distinguer les

microorganismes vivants et métaboliquement actifs de ceux métaboliquement inactifs ou morts (325). Lors d'un suivi longitudinal au cours d'une maladie chronique, il permet d'analyser l'évolution de l'activité microbienne et donc la réponse à une augmentation de l'activité de la maladie ou à un traitement. De nombreuses limites freinent la généralisation de cette méthode car la collecte et la conservation des échantillons doivent être minutieuses (congélation instantanée puis conservation à -80°C), la préparation des échantillons et leur analyse sont coûteuses et complexes et les ARN messagers de l'hôte ainsi que les ARN ribosomiaux doivent être éliminés.

La métaprotéomique est l'analyse de l'ensemble des protéines dans un échantillon par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. Malheureusement, il est actuellement impossible de distinguer les protéines dérivées de l'hôte des protéines dérivées du microbiote.

La métabolomique analyse la production de métabolites, également par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à une spectrométrie de masse ou à une spectrométrie à résonance magnétique. Cette technique est semi-quantitative et l'analyse peut être ciblée ou non ciblée. Comme pour la métaprotéomique, il est impossible de distinguer les métabolites issus de l'hôte ou de l'alimentation. La détection de tel ou tel métabolite est, de plus, extrêmement dépendante de la plateforme d'analyse et des bases de données.

L'intérêt des techniques de métaprotéomique ou de métabolomique est d'accéder au « produit final » actif fonctionnellement ou métaboliquement de façon plus fine que la métatranscriptomique. Ces informations ne sont pas négligeables. Pour rappel, le transfert de surnageant de selles a des effets similaires à ceux d'une transplantation fécale. La découverte des virus, protéines et métabolites présents dans ce surnageant apportera donc une information précieuse et complémentaire de la composition du microbiote (334).

La culturomique, par la multiplication des milieux et des conditions de culture, a également permis de découvrir de nouvelles espèces bactériennes lors de l'analyse des bactériotes par cette technique (182,335,336). De façon intéressante, en dehors d'un noyau commun, les espèces bactériennes identifiées par métagénomique et culturomique ne sont pas les mêmes (183). Cela pourrait s'expliquer par un état métabolique plus élevé des bactéries isolées en culturomique sans que cela n'ait été confirmé. Cette approche complémentaire reste actuellement confidentielle en raison du coût humain et en matériel qu'elle nécessite.

5.2.2. Intégration en multi-omique

Comme discuté précédemment, l'analyse de la composition microbienne n'est pas forcément suffisante en fonction du type de question de recherche. Pour de nombreux champs d'application, l'intégration des différents types de données (métagénomique par analyse de gènes d'intérêt ou shotgun, métatranscriptomique, métaprotéomique et métabolomique) est nécessaire à une meilleure compréhension du rôle du microbiote dans divers processus physiologiques et pathologiques (337). Cette analyse intégrée des différentes approches « omiques » est ainsi appelée multi-omique (338,339). Le problème est qu'aucune méthode de mesure n'est standardisée, que chaque technique d'analyse est sujet à de nombreux biais et qu'il est déjà difficile de comparer les résultats obtenus par deux équipes différentes pour la même approche omique. La comparaison de l'interaction entre plusieurs approches omiques entre différents travaux de recherche paraît actuellement illusoire et un travail titanesque de standardisation des outils techniques est nécessaire pour pouvoir avancer dans ce champ de recherche.

Une réflexion approfondie quant aux méthodes d'analyse bioinformatiques et biostatistiques est également indispensable. Par exemple, l'expression génique et la production de métabolites ne sont pas simultanées et le délai entre ces 2 événements peut varier en fonction des gènes et des métabolites étudiés. Le choix des temps d'analyse reste un domaine inconnu à l'heure actuelle. De plus, les outils statistiques de corrélation disponibles comme les coefficients de Pearson ou de Spearman ne sont pas adaptés au traitement de données de grande échelle et leur utilisation peut créer de nombreux faux positifs (325). Le développement de nouveaux outils d'analyse est donc indispensable et les travaux de modélisation menés en écologie ou dans l'analyse des interactions financières vont probablement largement inspirer les analyses des travaux sur le microbiote (340,341).

Par ailleurs, la correction pour tests multiples est indispensable lors des analyses omiques, les données contenant des milliers de microorganismes ou protéines ou métabolites différents, des corrélations statistiquement significatives uniquement liées au hasard sont attendues. Les corrections de Benjamini-Hochberg (« false discovery rate ») ou de Bonferroni (« family-wise error ») plus conservatrice doivent être appliquées.

5.2.3. Corrélation ou causalité ?

La découverte de corrélation entre composition du microbiote obtenue par métagénomique (ou toute autre donnée obtenue par une approche omique) n'est qu'une première étape dans la dissection de l'implication du microbiote dans tel ou tel processus. La recherche de causalité passe nécessairement par une meilleure compréhension des fonctions des microorganismes identifiés, or ceux-ci sont le plus souvent difficilement cultivables voire incultivables *a fortiori* en co-culture avec des cellules humaines. L'identification d'une protéine ou d'un métabolite candidat(e) nécessite la production de cette protéine ou de ce métabolite afin d'en tester les effets, sachant que c'est possiblement un « cocktail » de protéines et/ou métabolites qui est impliqué dans le processus. La modulation du microbiote d'un modèle animal (classiquement des souris gnotobiotiques à microbiote « contrôlé et humanisé ») ou d'un être humain (classiquement par transplantation fécale) peut aider à augmenter la probabilité d'une relation causale et non seulement de corrélation entre les variations d'un microbiote ou de ses métabolites et un processus physiopathologique.

Un lien de causalité est ainsi fortement suggéré dans l'obésité humaine (342), la perte de poids après chirurgie bariatrique (343) et l'insulinorésistance (197), le syndrome de Kwashiorkor (344) ou encore l'asthme pédiatrique (224). Dans de nombreux domaines, dont l'antibiorésistance, cette causalité reste encore entièrement à démontrer.

Plutôt qu'être source de découragement, toutes ces limites soulignent l'énorme travail de découverte tant technique, méthodologique et biostatistique qui reste à fournir pour améliorer notre compréhension du microbiote et de ses rôles en physiologie et pathologie humaines. Ces limites soulignent également la nécessité de travailler en équipe venant de plusieurs horizons (cliniciens, biologistes hospitaliers, chercheurs biologistes « humains » ou « environnementaux », spécialiste du séquençage, biostatisticiens et modélisateurs) devant la diversité des compétences requise.

Enfin, les théories de la philosophie de l'écologie de penseurs comme Ralph Waldo Emerson ou Henry David Thoreau ainsi que la pensée complexe développée par Edgar Morin peuvent apporter des clés conceptuelles permettant d'intégrer les résultats obtenus à un modèle plus global.

Conclusion

L'antibiorésistance est une menace grandissante pour la santé mondiale à tel point que l'OMS craint l'avènement d'un monde post-antibiotique. Des politiques visant à diminuer drastiquement la consommation d'antibiotiques, aussi bien dans l'environnement, en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine, ont vu le jour. Malheureusement, elles n'ont, pour le moment, pas été couronnées de succès. En complément de la diminution de la consommation d'antibiotiques, il importe de mieux comprendre les mécanismes de dissémination des bactéries porteuses de gènes de résistance ainsi que des gènes de résistance eux-mêmes. Les E-BLSE sont les bactéries résistantes les plus fréquemment rencontrées en médecine humaine en Europe, particulièrement en réanimation. Les gènes codant pour des enzymes BLSE ont connu une dissémination clonale et plasmidique majeure à la fin du 20^{ème} siècle mais les progrès du dépistage et surtout des procédures d'hygiène a changé la donne. La transmission croisée et la dissémination plasmidique ne permettent pas d'expliquer la majorité des cas d'acquisition d'E-BLSE en réanimation actuellement. Le fait d'être colonisé au niveau digestif par une E-BLSE est, certes, un facteur de risque d'infection à E-BLSE mais la prédiction individuelle est, aujourd'hui, impossible. La VPP d'avoir une PAVM à E-BLSE lorsque l'on est colonisé au niveau digestif par une E-BLSE est certes de 100% mais la VPP n'est que de 40% ce qui conduit probablement à une surconsommation de carbapénèmes chez les patients colonisés. Une meilleure compréhension du lien colonisation-infection et l'optimisation de l'antibiothérapie, probabiliste comme documentée, chez ces patients colonisés sont des axes majeurs d'amélioration de la prise en charge.

Des altérations qualitatives des bactériotes et des mycobiotés digestifs sont associées à la colonisation par une E-BLSE. Il est indispensable de prendre en compte l'impact de l'espèce porteuse d'E-BLSE dans les analyses de perturbations du microbiote associées à la colonisation. Le passage de la colonisation à l'infection par une E-BLSE pourrait s'expliquer par l'ajout d'altérations quantitatives des bactériotes et mycobiotés digestifs. De futures études incluant de plus nombreux patients et analysant les microbiotes associés à la colonisation par les différentes espèces d'E-BLSE indépendamment permettrait de préciser les modifications du microbiote associées à la colonisation et aux infections à E-BLSE. En cas de résultat significatif, des tentatives de décolonisation digestive d'E-BLSE pourraient être menées par des probiotiques « sur mesure ».

« Il faut apprendre à naviguer dans un océan d'incertitudes à travers des archipels de certitude. »

Edgar Morin

Bibliographie

1. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol.* sept 2019;4(9):1432-42.
2. Denis F, Ploy M-C, Martin C, Bingen E, Quentin R. *Bactériologie médicale, Techniques usuelles*. 2ème édition. Paris: Elsevier Masson; 2011.
3. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med.* mai 2012;18(5):263-72.
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. sixth. Washington, D.C.: ASM Press; 1995.
5. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Infection Control.* juin 2006;34(5):S20-8.
6. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* mars 2010;8(3):207-17.
7. Berthe T, Ratajczak M, Clermont O, Denamur E, Petit F. Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Appl Environ Microbiol.* 1 août 2013;79(15):4684-93.
8. Touchon M, Hoede C, Tenailon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *Casadesús J, éditeur. PLoS Genet.* 23 janv 2009;5(1):e1000344.
9. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports.* févr 2013;5(1):58-65.
10. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* avr 2003;5(5):449-56.
11. Lepape A, Machut A, Savey A. Réseau national Réa-Raisin de surveillance des infections acquises en réanimation adulte - Méthodes et principaux résultats. *Méd Intensive Réa.* 1 mai 2018;27(3):197-203.
12. Jagnow J. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology.* 1 sept 2003;149(9):2397-405.
13. Davin-Regli A, Lavigne J-P, Pagès J-M. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Reviews.* 17 juill 2019;32(4):e00002-19, /cmr/32/4/CMR.00002-19.atom.
14. Bertrand X. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamase in a French university-affiliated hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents.* août 2003;22(2):128-33.
15. Sanders WE, Sanders CC. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev.* avr 1997;10(2):220-41.
16. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* mars 2013;11(3):297-308.

17. Sader HS, Flamm RK, Streit JM, Farrell DJ, Jones RN. Ceftaroline activity against bacterial pathogens frequently isolated in U.S. medical centers: results from five years of the AWARE surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2015;59(4):2458-61.
18. Bonnet R. β -lactamines et entérobactérie. In: *Antibiogramme*. 3ème édition. Paris: Eska; 2012. p. 165-88.
19. Roberts JA, Paul SK, Akova M, Bassetti M, De Waele JJ, Dimopoulos G, et al. DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current β -lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin Infect Dis.* avr 2014;58(8):1072-83.
20. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 15 mai 1991;276 (Pt 1):269-70.
21. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2010;54(3):969-76.
22. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care* [Internet]. déc 2015 [cité 6 oct 2017];5(1). Disponible sur: <http://www.annalsofintensivecare.com/content/5/1/21>
23. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* oct 2005;18(4):657-86.
24. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1 janv 2004;48(1):1-14.
25. Matthew M, Hedges RW, Smith JT. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* juin 1979;138(3):657-62.
26. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* août 2013;303(6-7):305-17.
27. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 1995;39(6):1211-33.
28. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature.* 16 oct 1965;208(5007):239-41.
29. Medeiros AA. Beta-lactamases. *Br Med Bull.* janv 1984;40(1):18-27.
30. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* oct 2001;14(4):933-51, table of contents.
31. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* oct 1995;8(4):557-84.
32. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* déc 1983;11(6):315-7.
33. Tzouvelekis LS, Bonomo RA. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* nov 1999;5(11):847-64.

34. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* nov 1999;5(11):865-79.
35. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2010;54(1):24-38.
36. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2003;47(9):2859-63.
37. Zhao W-H, Hu Z-Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology.* févr 2013;39(1):79-101.
38. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* août 1988;32(8):1243-6.
39. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* oct 1990;18(5):294-8.
40. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection.* juin 1992;20(3):158-63.
41. Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother.* mai 1992;29(5):590-2.
42. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 1995;39(10):2269-75.
43. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 1996;40(2):509-13.
44. Gniadkowski M, Schneider I, Pałucha A, Jungwirth R, Mikiiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 1998;42(4):827-32.
45. Birkett CI, Ludlam HA, Woodford N, Brown DFJ, Brown NM, Roberts MTM, et al. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J Med Microbiol.* janv 2007;56(Pt 1):52-5.
46. Brolund A. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol.* 2014;4.
47. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2012 [cité 6 oct 2017];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00110/abstract>
48. Coque TM, Novais Â, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerging infectious diseases.* 2008;14(2):195.

49. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*. déc 2011;301(8):654-8.
50. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 juin 2009;53(6):2227-38.
51. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1 juin 2006;70(2):296-316.
52. Lartigue M-F, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. In Vitro Analysis of ISEcp1B-Mediated Mobilization of Naturally Occurring β -Lactamase Gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 avr 2006;50(4):1282-6.
53. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. sept 2011;35(5):736-55.
54. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 oct 2013;26(4):744-58.
55. Celenza G. Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 20 mars 2006;57(5):975-8.
56. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC infectious diseases*. 2012;12(1):176.
57. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial Transmission of CTX-M-2 β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* in a Neurosurgery Ward. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 sept 2004;42(9):3978-84.
58. Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. Genetic Features of CTX-M-15-Producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 déc 2011;55(12):5946-8.
59. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, et al. Plasmidic Extended-Spectrum β -Lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Isolates in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 mai 2002;46(5):1462-8.
60. Gómez-Garcés JL, Saéz D, Almagro M, Fernández-Romero S, Merino F, Campos J, et al. Osteomyelitis associated to CTX-M-15-producing *Aeromonas hydrophila*: first description in the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;70(3):420-422.
61. al Naiemi N, Duim B, Bart A. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Medical Microbiology*. 1 nov 2006;55(11):1607-8.
62. Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. déc 2008;6(12):893-903.
63. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Kaufmann ME, Mentis AF. Consecutive mutations leading to the emergence in vivo of imipenem resistance in a clinical strain of *Enterobacter aerogenes*. *J Med Microbiol*. juin 1994;40(6):403-7.

64. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* avr 2009;63(4):659-67.
65. Chia JH, Siu LK, Su LH, Lin HS, Kuo AJ, Lee MH, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. *J Chemother.* déc 2009;21(6):621-6.
66. Armand-Lefèvre L, Leflon-Guibout V, Bredin J, Barguelli F, Amor A, Pagès JM, et al. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2003;47(3):1165-8.
67. Lartigue M-F, Poirel L, Poyart C, Réglie-Poupet H, Nordmann P. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerging Infect Dis.* févr 2007;13(2):315-7.
68. García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, et al. An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2010;54(10):4178-84.
69. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology.* août 2013;303(6-7):298-304.
70. Decousser JW, Poirel L, Nordmann P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2001;45(12):3595-8.
71. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2002;46(9):3045-9.
72. Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2002;46(12):4038-40.
73. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, et al. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2005;49(5):2112-5.
74. Rodríguez MM, Power P, Sader H, Galleni M, Gutkind G. Novel chromosome-encoded CTX-M-78 beta-lactamase from a *Kluyvera georgiana* clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2010;54(7):3070-1.
75. Kollek R, Oertel W, Goebel W. Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication (« basic replicon ») of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1. *Mol Gen Genet.* 1 juin 1978;162(1):51-7.
76. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* sept 1988;52(3):375-95.
77. Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev.* déc 1987;51(4):381-95.
78. Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among fi^- R factors. *Nature.* 26 nov 1971;234(5326):222-3.

79. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*. déc 2005;63(3):219-28.
80. García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. juin 2008;61(6):1229-33.
81. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. déc 2010;65(12):2518-29.
82. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. oct 2010;54(10):4168-77.
83. Roberts RJ, Carneiro MO, Schatz MC. The advantages of SMRT sequencing. *Genome Biol*. 3 juill 2013;14(7):405.
84. Sandegren L, Linkevicius M, Lytsy B, Melhus Å, Andersson DI. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother*. janv 2012;67(1):74-83.
85. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2 janv 2009;323(5910):133-8.
86. Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods*. juin 2013;10(6):563-9.
87. Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, et al. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Sci Transl Med*. 17 sept 2014;6(254):254ra126.
88. Tegenfeldt JO, Prinz C, Cao H, Chou S, Reisner WW, Riehn R, et al. From the Cover: The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 27 juill 2004;101(30):10979-83.
89. Nyberg LK, Persson F, Berg J, Bergström J, Fransson E, Olsson L, et al. A single-step competitive binding assay for mapping of single DNA molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. 6 janv 2012;417(1):404-8.
90. Frykholm K, Nyberg LK, Lagerstedt E, Noble C, Fritzsche J, Karami N, et al. Fast size-determination of intact bacterial plasmids using nanofluidic channels. *Lab Chip*. 7 juill 2015;15(13):2739-43.
91. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem*. 10 avr 1995;226(2):235-40.
92. Nordström K. Plasmid R1--replication and its control. *Plasmid*. janv 2006;55(1):1-26.
93. Datta N, Hughes VM. Plasmids of the same Inc groups in *Enterobacteria* before and after the medical use of antibiotics. *Nature*. 8 déc 1983;306(5943):616-7.

94. Bengtsson S, Naseer U, Sundsfjord A, Kahlmeter G, Sundqvist M. Sequence types and plasmid carriage of uropathogenic *Escherichia coli* devoid of phenotypically detectable resistance. *J Antimicrob Chemother.* janv 2012;67(1):69-73.
95. Dolejska M, Villa L, Hasman H, Hansen L, Carattoli A. Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J Antimicrob Chemother.* févr 2013;68(2):333-9.
96. Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2009;53(4):1709-11.
97. Kim SR, Komano T. The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. *J Bacteriol.* juin 1997;179(11):3594-603.
98. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* juin 2011;17(6):873-80.
99. Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2009;53(10):4472-82.
100. Hopkins KL, Deheer-Graham A, Threlfall EJ, Batchelor MJ, Liebana E. Novel plasmid-mediated CTX-M-8 subgroup extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-40) isolated in the UK. *Int J Antimicrob Agents.* juin 2006;27(6):572-5.
101. Ma L, Siu LK, Lu P-L. Effect of spacer sequences between blaCTX-M and ISEcp1 on blaCTX-M expression. *Journal of Medical Microbiology.* 1 déc 2011;60(12):1787-92.
102. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution.* juill 2012;12(5):883-93.
103. Morosini M-I, Valverde A, García-Castillo M, Nordmann P, Cantón R. Persistent isolation of *Salmonella* Concord harbouring CTX-M-15, SHV-12 and QnrA1 in an asymptomatic adopted Ethiopian child in Spain also colonized with CTX-M-14- and QnrB-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* juill 2010;65(7):1545-6.
104. Partridge SR, Ellem JA, Tetu SG, Zong Z, Paulsen IT, Iredell JR. Complete Sequence of pJIE143, a pir-Type Plasmid Carrying ISEcp1-blaCTX-M-15 from an *Escherichia coli* ST131 Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1 déc 2011;55(12):5933-5.
105. Nakano R, Nakano A, Abe M, Inoue M, Okamoto R. Regional outbreak of CTX-M-2 - lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *Journal of Medical Microbiology.* 1 déc 2012;61(Pt_12):1727-35.
106. Baraniak A, Fielt J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide Spread of CTX-M-3 Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Microorganisms of the Family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1 janv 2002;46(1):151-9.
107. He L, Partridge SR, Yang X, Hou J, Deng Y, Yao Q, et al. Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33:A-B-type epidemic plasmid carrying blaCTX-M-65, fosA3 and rmtB from China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 janv 2013;68(1):46-50.

108. Valverde A, Canton R, Garcillan-Barcia MP, Novais A, Galan JC, Alvarado A, et al. Spread of blaCTX-M-14 Is Driven Mainly by IncK Plasmids Disseminated among Escherichia coli Phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 déc 2009;53(12):5204-12.
109. Cottell JL, Webber MA, Coldham NG, Taylor DL, Cerdeño-Tárraga AM, Hauser H, et al. Complete Sequence and Molecular Epidemiology of IncK Epidemic Plasmid Encoding bla_{CTX-M-14}. *Emerging Infectious Diseases*. avr 2011;17(4):645-52.
110. Stokes MO, Cottell JL, Piddock LJV, Wu G, Wootton M, Mevius DJ, et al. Detection and characterization of pCT-like plasmid vectors for blaCTX-M-14 in Escherichia coli isolates from humans, turkeys and cattle in England and Wales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. juill 2012;67(7):1639-44.
111. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. août 2005;43(8):4178-82.
112. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. oct 2007;13 Suppl 3:1-46.
113. Coenye T, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of Burkholderia cepacia genomovar III. *J Clin Microbiol*. sept 2002;40(9):3300-7.
114. Long SG, DuPont HL, Gaul L, Arafat RR, Selwyn BJ, Rogers J, et al. Pulsed-field gel electrophoresis for Salmonella infection surveillance, Texas, USA, 2007. *Emerging Infect Dis*. juin 2010;16(6):983-5.
115. Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, et al. UK epidemic Escherichia coli strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother*. déc 2008;62(6):1241-4.
116. Ligozzi M, Fontana R, Aldegheri M, Scalet G, Lo Cascio G. Comparative evaluation of an automated repetitive-sequence-based PCR instrument versus pulsed-field gel electrophoresis in the setting of a Serratia marcescens nosocomial infection outbreak. *J Clin Microbiol*. mai 2010;48(5):1690-5.
117. Ratkai C, Peixe LV, Grosso F, Freitas AR, Antunes P, Fodor E, et al. Successful application of the DiversiLab repetitive-sequence-based PCR typing system for confirmation of the circulation of a multiresistant Pseudomonas aeruginosa clone in different hospital wards. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juin 2010;67(2):202-6.
118. Lindstedt B-A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*. juin 2005;26(13):2567-82.
119. Turton JF, Matos J, Kaufmann ME, Pitt TL. Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of Acinetobacter baumannii. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. mai 2009;28(5):499-507.
120. Kendall EA, Chowdhury F, Begum Y, Khan AI, Li S, Thierer JH, et al. Relatedness of Vibrio cholerae O1/O139 isolates from patients and their household contacts, determined by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J Bacteriol*. sept 2010;192(17):4367-76.

121. Lewis T, Loman NJ, Bingle L, Jumaa P, Weinstock GM, Mortiboy D, et al. High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak. *Journal of Hospital Infection*. mai 2010;75(1):37-41.
122. Niemann S, Köser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, et al. Genomic Diversity among Drug Sensitive and Multidrug Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with Identical DNA Fingerprints. Ahmed N, éditeur. *PLoS ONE*. 12 oct 2009;4(10):e7407.
123. Zhang W. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome Research*. 1 juin 2006;16(6):757-67.
124. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. janv 2011;66(1):1-14.
125. Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. févr 2008;61(2):273-81.
126. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*. avr 2010;35(4):316-21.
127. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Trott DJ. Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia. *J Antimicrob Chemother*. sept 2010;65(9):1936-8.
128. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother*. août 2009;64(2):274-7.
129. Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, et al. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother*. mars 2011;66(3):512-6.
130. Karisik E, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. janv 2008;61(1):54-8.
131. Bert F, Johnson JR, Ouattara B, Leflon-Guibout V, Johnston B, Marcon E, et al. Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis. *J Clin Microbiol*. août 2010;48(8):2709-14.
132. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States. *CLIN INFECT DIS*. août 2010;51(3):286-94.
133. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. oct 2004;54(4):735-43.
134. Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist*. mars 2011;17(1):83-97.
135. Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Pérez-Vázquez M, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus

- sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents*. août 2009;34(2):173-6.
136. Okeke IN, Wallace-Gadsden F, Simons HR, Matthews N, Labar AS, Hwang J, et al. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. *PLoS ONE*. 23 nov 2010;5(11):e14093.
137. Fam N, Leflon-Guibout V, Fouad S, Aboul-Fadl L, Marcon E, Desouky D, et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microb Drug Resist*. mars 2011;17(1):67-73.
138. Bartoloni A, Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Magnelli D, Di Maggio T, et al. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin Microbiol Infect*. avr 2013;19(4):356-61.
139. Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, et al. Clonal structure, extended-spectrum β -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2013;57(1):309-16.
140. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new « MRSA's »? *J Antimicrob Chemother*. nov 2008;62(5):978-85.
141. Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, et al. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother*. sept 2009;64(3):524-8.
142. Lee MY, Ko KS, Kang C-I, Chung DR, Peck KR, Song J-H. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents*. août 2011;38(2):160-3.
143. Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, et al. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a bla VIM-1 metallo- β -lactamase gene. *J Clin Microbiol*. oct 2005;43(10):5344-7.
144. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2009;53(8):3365-70.
145. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. sept 2010;10(9):597-602.
146. Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther*. mars 2013;11(3):321-31.

147. Delannoy M, Agrinier N, Charmillon A, Degand N, Dellamonica J, Leone M, et al. Implementation of antibiotic stewardship programmes in French ICUs in 2018: a nationwide cross-sectional survey. *J Antimicrob Chemother.* 1 juill 2019;74(7):2106-14.
148. Timsit J-F, Pilmis B, Zahar J-R. How Should We Treat Hospital-Acquired and Ventilator-Associated Pneumonia Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae? *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* juin 2017;38(03):287-300.
149. Barbier F, Pommier C, Essaïed W, Garrouste-Orgeas M, Schwebel C, Ruckly S, et al. Colonization and infection with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in ICU patients: what impact on outcomes and carbapenem exposure? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* avr 2016;71(4):1088-97.
150. Armand-Lefevre L, Angebault C, Barbier F, Hamelet E, Defrance G, Ruppe E, et al. Emergence of Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli in Intestinal Flora of Intensive Care Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1 mars 2013;57(3):1488-95.
151. McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, Qi C, Bolon M, Scheetz MH. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2013;57(10):5131-3.
152. Boucher A, Meybeck A, Patoz P, Valette M, Thellier D, Delannoy PY, et al. Alternatives to carbapenems in ventilator-associated pneumonia due to ESBL-producing Enterobacteriaceae. *J Infect.* 2016;73(3):293-6.
153. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, Mo Y, Lee TH, Yilmaz M, et al. Effect of Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for Patients With E coli or Klebsiella pneumoniae Bloodstream Infection and Ceftriaxone Resistance: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 11 2018;320(10):984-94.
154. Prevel R, Berdai D, Boyer A. Antibiotics for Ceftriaxone-Resistant Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections. *JAMA.* 12 2019;321(6):613.
155. Sfeir MM. Post- MERINO trial: Any role for piperacillin-tazobactam in treating bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae? *International Journal of Antimicrobial Agents* [Internet]. mars 2019 [cité 22 mars 2019]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857919300603>
156. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Kahlmeter G. Antibiotics for Ceftriaxone-Resistant Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections. *JAMA.* 12 févr 2019;321(6):612.
157. Castanheira M, Doyle TB, Mendes RE, Sader HS. Comparative Activities of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam against Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases from U.S. Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2019;63(7).
158. Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, Zamorano L, Moyà B, Juan C, et al. Pseudomonas aeruginosa ceftolozane-tazobactam resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of AmpC. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2014;58(6):3091-9.
159. Nicolas-Chanoine M-H, Mayer N, Guyot K, Dumont E, Pagès J-M. Interplay Between Membrane Permeability and Enzymatic Barrier Leads to Antibiotic-Dependent Resistance in Klebsiella Pneumoniae. *Front Microbiol.* 2018;9:1422.

160. Razazi K, Derde LPG, Verachten M, Legrand P, Lesprit P, Brun-Buisson C. Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit. *Intensive Care Medicine*. nov 2012;38(11):1769-78.
161. for the OUTCOMEREA Study Group, Barbier F, Bailly S, Schwebel C, Papazian L, Azoulay É, et al. Infection-related ventilator-associated complications in ICU patients colonised with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Intensive Care Medicine*. mai 2018;44(5):616-26.
162. Martins IS, Pessoa-Silva CL, Nouer SA, Pessoa de Araujo EG, Ferreira ALP, Riley LW, et al. Endemic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* at an intensive care unit: risk factors for colonization and infection. *Microb Drug Resist*. 2006;12(1):50-8.
163. Razazi K, Mekontso Dessap A, Carteaux G, Jansen C, Decousser J-W, de Prost N, et al. Frequency, associated factors and outcome of multi-drug-resistant intensive care unit-acquired pneumonia among patients colonized with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Annals of Intensive Care [Internet]*. déc 2017 [cité 31 oct 2018];7(1). Disponible sur: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0283-4>
164. Carbonne H, Le Dorze M, Bourrel A-S, Poupet H, Poyart C, Cambau E, et al. Relation between presence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in systematic rectal swabs and respiratory tract specimens in ICU patients. *Annals of Intensive Care [Internet]*. déc 2017 [cité 6 oct 2017];7(1). Disponible sur: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0237-x>
165. Bruyère R, Vigneron C, Bador J, Aho S, Toitot A, Quenot J-P, et al. Significance of Prior Digestive Colonization With Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Patients With Ventilator-Associated Pneumonia: *Critical Care Medicine*. nov 2015;1.
166. Houard M, Rouzé A, Ledoux G, Six S, Jaillette E, Poissy J, et al. Relationship between digestive tract colonization and subsequent ventilator-associated pneumonia related to ESBL-producing Enterobacteriaceae. Kou YR, éditeur. *PLOS ONE*. 8 août 2018;13(8):e0201688.
167. Falcone M, Vena A, Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Goldoni P, et al. Role of empirical and targeted therapy in hospitalized patients with bloodstream infections caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae. *Ann Ig*. août 2014;26(4):293-304.
168. Joo E-J, Park DA, Lee NR, Moon S-Y, Choi J-K, Ko J-H, et al. Impact of appropriateness of empiric therapy on outcomes in community-onset bacteremia by extended-spectrum- β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* definitively treated with carbapenems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. nov 2017;36(11):2093-100.
169. Vogelaers D, De Bels D, Forêt F, Cran S, Gilbert E, Schoonheydt K, et al. Patterns of antimicrobial therapy in severe nosocomial infections: empiric choices, proportion of appropriate therapy, and adaptation rates--a multicentre, observational survey in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*. avr 2010;35(4):375-81.
170. Scheuerman O, Schechner V, Carmeli Y, Gutiérrez-Gutiérrez B, Calbo E, Almirante B, et al. Comparison of Predictors and Mortality Between Bloodstream Infections Caused by ESBL-Producing *Escherichia coli* and ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39(6):660-7.
171. Jalalzai W, Boutrot M, Guinard J, Guigon A, Bret L, Poisson D-M, et al. Cessation of screening for intestinal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a low-

- endemicity intensive care unit with universal contact precautions. *Clinical Microbiology and Infection*. avr 2018;24(4):429.e7-429.e12.
172. Zahar J-R, Blot S, Nordmann P, Martischang R, Timsit J-F, Harbarth S, et al. Screening for Intestinal Carriage of Extended-spectrum Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Critically Ill Patients: Expected Benefits and Evidence-based Controversies. *Clinical Infectious Diseases*. 30 mai 2019;68(12):2125-30.
 173. Boyer A, Goret J, Clouzeau B, Romen A, Prevel R, Lhomme E, et al. Tailoring Empirical Antimicrobial Therapy in Subjects With Ventilator-Associated Pneumonia With a 10-Hour E-Test Approach. *Respir Care*. mars 2019;64(3):307-12.
 174. Boyer A, Medrano J, Mzali F, Balick-Weber C-C, Bessède E, Picard W, et al. Direct testing of bronchoalveolar lavages from ventilator-associated pneumonia patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juin 2012;73(2):107-10.
 175. Meyer E, Lapatschek M, Bechtold A, Schwarzkopf G, Gastmeier P, Schwab F. Impact of restriction of third generation cephalosporins on the burden of third generation cephalosporin resistant *K. pneumoniae* and *E. coli* in an ICU. *Intensive Care Medicine*. mai 2009;35(5):862-70.
 176. Boyer A, Couallier V, Clouzeau B, Lasheras A, M'zali F, Kann M, et al. Control of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae nosocomial acquisition in an intensive care unit: A time series regression analysis. *American Journal of Infection Control*. déc 2015;43(12):1296-301.
 177. Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 01 2016;63(3):310-8.
 178. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* [Internet]. nov 2018 [cité 14 nov 2018]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918306054>
 179. Hoffman SJ, Outtersen K, Røttingen J-A, Cars O, Clift C, Rizvi Z, et al. An international legal framework to address antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*. 1 févr 2015;93(2):66-66.
 180. White A, Hughes JM. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *Ecohealth*. 28 juin 2019;
 181. Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. juill 2014;12(7):465-78.
 182. Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. janv 2015;28(1):208-36.
 183. Lagier J-C, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect*. déc 2012;18(12):1185-93.
 184. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 28 janv 2016;164(3):337-40.

185. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 4 mars 2010;464(7285):59-65.
186. Huseyin CE, O'Toole PW, Cotter PD, Scanlan PD. Forgotten fungi-the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiol Rev*. 01 2017;41(4):479-511.
187. Limon JJ, Skalski JH, Underhill DM. Commensal Fungi in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 9 août 2017;22(2):156-65.
188. Wheeler ML, Limon JJ, Bar AS, Leal CA, Gargus M, Tang J, et al. Immunological Consequences of Intestinal Fungal Dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 8 juin 2016;19(6):865-73.
189. Enaud R, Vandenborgh L-E, Coron N, Bazin T, Prevel R, Schaevebeke T, et al. The Mycobiome: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Microorganisms*. 9 mars 2018;6(1):22.
190. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H-P, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. juin 2017;66(6):1039-48.
191. Abeles SR, Pride DT. Molecular Bases and Role of Viruses in the Human Microbiome. *Journal of Molecular Biology*. nov 2014;426(23):3892-906.
192. Scarpellini E, Ianiro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*. déc 2015;47(12):1007-12.
193. Babickova J. Pathological and therapeutic interactions between bacteriophages, microbes and the host in inflammatory bowel disease. *WJG*. 2015;21(40):11321.
194. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Research*. 1 oct 2011;21(10):1616-25.
195. Aminov RI. Role of archaea in human disease. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2013 [cité 25 juill 2019];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00042/abstract>
196. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science*. 9 avr 2010;328(5975):228-31.
197. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*. oct 2012;143(4):913-916.e7.
198. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*. oct 2015;11(10):577-91.
199. Devlin AS, Fischbach MA. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat Chem Biol*. sept 2015;11(9):685-90.
200. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. juin 2012;486(7402):222-7.
201. Shi Y, Mu L. An expanding stage for commensal microbes in host immune regulation. *Cell Mol Immunol*. avr 2017;14(4):339-48.

202. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*. 19 juin 2017;15(10):630-8.
203. Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell. mars* 2014;157(1):121-41.
204. Chiu L, Bazin T, Truchetet M-E, Schaeveerbeke T, Delhaes L, Pradeu T. Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 7 déc 2017 [cité 12 déc 2017];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01678/full>
205. Ijssennagger N, Belzer C, Hooiveld GJ, Dekker J, van Mil SWC, Müller M, et al. Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11 août 2015;112(32):10038-43.
206. Reinhardt C, Bergental M, Greiner TU, Schaffner F, Östergren-Lundén G, Petersen LC, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature. mars* 2012;483(7391):627-31.
207. Mosser C-A, Baptista S, Arnoux I, Audinat E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Progress in Neurobiology*. févr 2017;149-150:1-20.
208. Thion MS, Low D, Silvin A, Chen J, Grisel P, Schulte-Schrepping J, et al. Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell* [Internet]. déc 2017 [cité 9 janv 2018]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417314320>
209. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*. avr 2015;161(2):264-76.
210. van Sadelhoff JHJ, Perez Pardo P, Wu J, Garssen J, van Bergenhenegouwen J, Hogenkamp A, et al. The Gut-Immune-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders; A Focus on Amino Acids. *Front Endocrinol*. 16 avr 2019;10:247.
211. Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. Banin E, éditeur. *FEMS Microbiology Reviews*. juill 2015;39(4):509-21.
212. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. avr 2012;13(4):260-70.
213. Hooks KB, O'Malley MA. Dysbiosis and Its Discontents. Davies JE, éditeur. *mBio*. 8 nov 2017;8(5):e01492-17, /mbio/8/5/e01492-17.atom.
214. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science*. 6 nov 2015;350(6261):663-6.
215. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 nov 2005;43(11):5588-92.
216. Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. *Science*. 8 juin 2012;336(6086):1255-62.

217. Wang S, Charbonnier L-M, Noval Rivas M, Georgiev P, Li N, Gerber G, et al. MyD88 Adaptor-Dependent Microbial Sensing by Regulatory T Cells Promotes Mucosal Tolerance and Enforces Commensalism. *Immunity*. août 2015;43(2):289-303.
218. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell*. nov 2014;159(4):789-99.
219. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*. juin 2015;17(6):852.
220. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. janv 2014;505(7484):559-63.
221. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. août 2012;488(7413):621-6.
222. Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of the Active Human Gut Microbiome. *Cell*. janv 2013;152(1-2):39-50.
223. Hsiao A, Ahmed AMS, Subramanian S, Griffin NW, Drewry LL, Petri WA, et al. Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature*. nov 2014;515(7527):423-6.
224. Fujimura KE, Demoor T, Rauch M, Faruqi AA, Jang S, Johnson CC, et al. House dust exposure mediates gut microbiome *Lactobacillus* enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 14 janv 2014;111(2):805-10.
225. Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, Tengeler AC, et al. Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell*. oct 2014;159(3):514-29.
226. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* [Internet]. 15 nov 2017 [cité 9 janv 2018]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature24460>
227. O'Sullivan O, Cronin O, Clarke SF, Murphy EF, Molloy MG, Shanahan F, et al. Exercise and the microbiota. *Gut Microbes*. 4 mars 2015;6(2):131-6.
228. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *Phimister EG, éditeur. N Engl J Med*. 15 déc 2016;375(24):2369-79.
229. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. juin 2012;486(7402):207-14.
230. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. août 2012;488(7410):178-84.
231. McDonald D, Ackermann G, Khailova L, Baird C, Heyland D, Kozar R, et al. Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. *mSphere*. août 2016;1(4).
232. Zaborin A, Smith D, Garfield K, Quensen J, Shakhsheer B, Kade M, et al. Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *MBio*. 23 sept 2014;5(5):e01361-01314.

233. Lankelma JM, van Vught LA, Belzer C, Schultz MJ, van der Poll T, de Vos WM, et al. Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study. *Intensive Care Med.* janv 2017;43(1):59-68.
234. Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(2):135-43.
235. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine.* juin 2016;22(6):458-78.
236. Wolff NS, Hugenholtz F, Wiersinga WJ. The emerging role of the microbiota in the ICU. *Crit Care.* 20 mars 2018;22(1):78.
237. Li Q, Wang C, Tang C, He Q, Zhao X, Li N, et al. Therapeutic modulation and reestablishment of the intestinal microbiota with fecal microbiota transplantation resolves sepsis and diarrhea in a patient. *Am J Gastroenterol.* nov 2014;109(11):1832-4.
238. Li Q, Wang C, Tang C, He Q, Zhao X, Li N, et al. Successful treatment of severe sepsis and diarrhea after vagotomy utilizing fecal microbiota transplantation: a case report. *Crit Care.* 9 févr 2015;19:37.
239. Wei Y, Yang J, Wang J, Yang Y, Huang J, Gong H, et al. Successful treatment with fecal microbiota transplantation in patients with multiple organ dysfunction syndrome and diarrhea following severe sepsis. *Crit Care.* 18 oct 2016;20(1):332.
240. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* mars 2013;13(3):260-8.
241. Monneret G, Gossez M, Venet F. Sepsis in PD-1 light. *Critical Care [Internet].* déc 2016 [cité 12 déc 2017];20(1). Disponible sur: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-016-1370-x>
242. Hotchkiss RS, Colston E, Yende S, Angus DC, Moldawer LL, Crouser ED, et al. Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis: A Phase 1b Randomized, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study of Antiprogrammed Cell Death-Ligand 1 Antibody (BMS-936559)*. *Critical Care Medicine.* mai 2019;47(5):632-42.
243. Routy B, Chatelier EL, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2 nov 2017;eaan3706.
244. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti–PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science.* 2 nov 2017;eaan4236.
245. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre M-L, et al. The commensal microbiome is associated with anti–PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science.* 5 janv 2018;359(6371):104-8.
246. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature.* 2019;565(7741):600-5.
247. Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, Falkowski NR, Erb-Downward JR, Standiford TJ, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nature Microbiology.* 18 juill 2016;1(10):16113.

248. Panzer AR, Lynch SV, Langelier C, Christie JD, McCauley K, Nelson M, et al. Lung Microbiota is Related to Smoking Status and to Development of ARDS in Critically Ill Trauma Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [Internet]. 16 oct 2017 [cité 28 nov 2017]; Disponible sur: <http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201702-0441OC>
249. Pamer EG. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*. 29 avr 2016;352(6285):535-8.
250. Abt MC, Pamer EG. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. *Curr Opin Immunol*. août 2014;29:16-22.
251. Costea PI, Hildebrand F, Manimozhiyan A, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology*. janv 2018;3(1):8-16.
252. Schulfer AF, Battaglia T, Alvarez Y, Bijmens L, Ruiz VE, Ho M, et al. Intergenerational transfer of antibiotic-perturbed microbiota enhances colitis in susceptible mice. *Nat Microbiol*. 27 nov 2017;
253. Zakharkina T, Martin-Loeches I, Matamoros S, Pova P, Torres A, Kastelijn JB, et al. The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. *Thorax*. sept 2017;72(9):803-10.
254. Kelly BJ, Imai I, Bittinger K, Laughlin A, Fuchs BD, Bushman FD, et al. Composition and dynamics of the respiratory tract microbiome in intubated patients. *Microbiome*. 11 févr 2016;4:7.
255. Brown RL, Sequeira RP, Clarke TB. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nature Communications* [Internet]. déc 2017 [cité 21 févr 2018];8(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-01803-x>
256. Brown RL, Clarke TB. The regulation of host defences to infection by the microbiota. *Immunology*. janv 2017;150(1):1-6.
257. Clarke TB. Early innate immunity to bacterial infection in the lung is regulated systemically by the commensal microbiota via nod-like receptor ligands. *Infect Immun*. nov 2014;82(11):4596-606.
258. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med*. févr 2010;16(2):228-31.
259. Yan Q, Cui S, Chen C, Li S, Sha S, Wan X, et al. Metagenomic Analysis of Sputum Microbiome as a Tool toward Culture-Independent Pathogen Detection of Patients with Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 01 2016;194(5):636-9.
260. Emonet S, Lazarevic V, Leemann Refondini C, Gaïa N, Leo S, Girard M, et al. Identification of respiratory microbiota markers in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 17 juin 2019;
261. Pileggi C, Bianco A, Flotta D, Nobile CGA, Pavia M. Prevention of ventilator-associated pneumonia, mortality and all intensive care unit acquired infections by topically applied antimicrobial or antiseptic agents: a meta-analysis of randomized controlled trials in intensive care units. *Crit Care*. 24 juin 2011;15(3):R155.

262. Al Naiemi N, Heddema ER, Bart A, de Jonge E, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PHM, et al. Emergence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria during selective decontamination of the digestive tract on an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* oct 2006;58(4):853-6.
263. Halaby T, Al Naiemi N, Kluytmans J, van der Palen J, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Emergence of colistin resistance in Enterobacteriaceae after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2013;57(7):3224-9.
264. Zeng J, Wang C-T, Zhang F-S, Qi F, Wang S-F, Ma S, et al. Effect of probiotics on the incidence of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients: a randomized controlled multicenter trial. *Intensive Care Med.* juin 2016;42(6):1018-28.
265. Petrof EO, Dhaliwal R, Manzanares W, Johnstone J, Cook D, Heyland DK. Probiotics in the critically ill: a systematic review of the randomized trial evidence. *Crit Care Med.* déc 2012;40(12):3290-302.
266. Araos R, Tai AK, Snyder GM, Blaser MJ, D'agata EM. Predominance of Lactobacillus spp. among patients who do not acquire multidrug-resistant organisms. *Clinical Infectious Diseases.* 2016;63(7):937–943.
267. Piewngam P, Quiñones M, Thirakittiwatthana W, Yungyuen T, Otto M, Kiratisin P. Composition of the intestinal microbiota in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae carriers and non-carriers in Thailand. *International Journal of Antimicrobial Agents* [Internet]. déc 2018 [cité 20 déc 2018]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857918303686>
268. Tacconelli E, Mazzaferri F, de Smet AM, Bragantini D, Eggimann P, Huttner BD, et al. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers. *Clin Microbiol Infect.* juill 2019;25(7):807-17.
269. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *N Engl J Med.* 31 janv 2013;368(5):407-15.
270. Crum-Cianflone NF, Sullivan E, Ballon-Landa G. Fecal Microbiota Transplantation and Successful Resolution of Multidrug-Resistant-Organism Colonization. Onderdonk AB, éditeur. *Journal of Clinical Microbiology.* juin 2015;53(6):1986-9.
271. Singh R, van Nood E, Nieuwdorp M, van Dam B, ten Berge IJM, Geerlings SE, et al. Donor feces infusion for eradication of Extended Spectrum beta-Lactamase producing Escherichia coli in a patient with end stage renal disease. *Clinical Microbiology and Infection.* nov 2014;20(11):O977-8.
272. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, et al. A five-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: A Randomized Clinical Trial. *Clin Microbiol Infect.* 4 janv 2019;
273. Faecal quality control. *Nat Microbiol.* août 2019;4(8):1243-1243.
274. Singer BH, Dickson RP, Denstaedt SJ, Newstead MW, Kim K, Falkowski NR, et al. Bacterial Dissemination to the Brain in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mars 2018;197(6):747-56.

275. Taur Y, Coyte K, Schluter J, Robilotti E, Figueroa C, Gjonbalaj M, et al. Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant. *Sci Transl Med.* 26 sept 2018;10(460):eaap9489.
276. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell.* sept 2018;174(6):1406-1423.e16.
277. Caballero S, Kim S, Carter RA, Leiner IM, Sušac B, Miller L, et al. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host Microbe.* 10 mai 2017;21(5):592-602.e4.
278. Jiang TT, Shao T-Y, Ang WXG, Kinder JM, Turner LH, Pham G, et al. Commensal Fungi Recapitulate the Protective Benefits of Intestinal Bacteria. *Cell Host & Microbe [Internet].* 22 nov 2017 [cité 27 nov 2017];0(0). Disponible sur: [http://www.cell.com/cell-host-microbe/abstract/S1931-3128\(17\)30448-1](http://www.cell.com/cell-host-microbe/abstract/S1931-3128(17)30448-1)
279. De Brucker K, Tan Y, Vints K, De Cremer K, Braem A, Verstraeten N, et al. Fungal β -1,3-Glucan Increases Ofloxacin Tolerance of *Escherichia coli* in a Polymicrobial *E. coli*/*Candida albicans* Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2015;59(6):3052-8.
280. Mullish BH, McDonald JAK, Pechlivanis A, Allegretti JR, Kao D, Barker GF, et al. Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Gut.* 11 févr 2019;gutjnl-2018-317842.
281. Carlsson AH, Yakymenko O, Olivier I, Håkansson F, Postma E, Keita ÅV, et al. Faecalibacterium prausnitzii supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* oct 2013;48(10):1136-44.
282. Meelu P, Marin R, Clish C, Zella G, Cox S, Yajnik V, et al. Impaired Innate Immune Function Associated with Fecal Supernatant from Crohn's Disease Patients: Insights into Potential Pathogenic Role of the Microbiome. *Inflammatory Bowel Diseases.* juill 2014;20(7):1139-46.
283. Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard J-D, Debarbieux L. Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 10 juin 2019;63(8):e00379-19, /aac/63/8/AAC.00379-19.atom.
284. Dufour N, Delattre R, Ricard J-D, Debarbieux L. The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams. *Clinical Infectious Diseases.* 1 juin 2017;64(11):1582-8.
285. Prevel R, Dufour N. Potentialités des bactériophages pour l'infectiologie moderne. *La Revue de Médecine Interne.* oct 2016;37(10):657-60.
286. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard J-D. Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages*: *Critical Care Medicine.* juin 2015;43(6):e190-8.
287. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, et al. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe.* 12 juill 2017;22(1):38-47.e4.
288. Nguyen S, Baker K, Padman BS, Patwa R, Dunstan RA, Weston TA, et al. Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *Racaniello VR, éditeur. mBio.* 29 déc 2017;8(6):e01874-17.

289. Zhang A, Call DR, Besser TE, Liu J, Jones L, Wang H, et al. β -lactam resistance genes in bacteriophage and bacterial DNA from wastewater, river water, and irrigation water in Washington State. *Water Res.* 15 sept 2019;161:335-40.
290. Wang M, Liu P, Zhou Q, Tao W, Sun Y, Zeng Z. Estimating the contribution of bacteriophage to the dissemination of antibiotic resistance genes in pig feces. *Environ Pollut.* juill 2018;238:291-8.
291. Mogna L, Deidda F, Nicola S, Amoruso A, Del Piano M, Mogna G. In Vitro Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *delbrueckii* LDD01 (DSM 22106): An Innovative Strategy to Possibly Counteract Such Infections in Humans? *Journal of Clinical Gastroenterology.* 2016;50:S136-9.
292. Kunishima H, Ishibashi N, Wada K, Oka K, Takahashi M, Yamasaki Y, et al. The effect of gut microbiota and probiotic organisms on the properties of extended spectrum beta-lactamase producing and carbapenem resistant Enterobacteriaceae including growth, beta-lactamase activity and gene transmissibility. *Journal of Infection and Chemotherapy.* juin 2019;S1341321X19301345.
293. Sorbara MT, Dubin K, Littmann ER, Moody TU, Fontana E, Seok R, et al. Inhibiting antibiotic-resistant Enterobacteriaceae by microbiota-mediated intracellular acidification. *J Exp Med.* 7 janv 2019;216(1):84-98.
294. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews.* 1 juill 2013;26(3):547-603.
295. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0 [Internet]. 2016. Disponible sur: <http://www.eucast.org>
296. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauger S, Gibot S, et al. Brief summary of French guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of hospital-acquired pneumonia in ICU. *Ann Intensive Care.* 3 nov 2018;8(1):104.
297. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* juill 2016;13(7):581-3.
298. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 2017;11(12):2639-43.
299. Alves M, Lemire A, Decré D, Margetis D, Bigé N, Pichereau C, et al. Extended-spectrum beta-lactamase – producing enterobacteriaceae in the intensive care unit: acquisition does not mean cross-transmission. *BMC Infectious Diseases* [Internet]. déc 2016 [cité 6 oct 2017];16(1). Disponible sur: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1489-z>
300. Repessé X, Artiguenave M, Paktoris-Papine S, Espinasse F, Dinh A, Charron C, et al. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in an intensive care unit with no single rooms. *Annals of Intensive Care* [Internet]. déc 2017 [cité 6 oct 2017];7(1). Disponible sur: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0295-0>
301. O'Connell N, Keating D, Kavanagh J, Schaffer K. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in high-risk patients in an Irish tertiary care hospital. *J Hosp Infect.* juin 2015;90(2):102-7.

302. Kim J, Lee JY, Kim SI, Song W, Kim J-S, Jung S, et al. Rates of fecal transmission of extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients in intensive care units in Korea. *Ann Lab Med.* janv 2014;34(1):20-5.
303. Seo B, Yoo JE, Lee YM, Ko G. *Sellimonas intestinalis* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* févr 2016;66(2):951-6.
304. Versluis D, de J Bello González T, Zoetendal EG, Passel MWJ van, Smidt H. High throughput cultivation-based screening on porous aluminum oxide chips allows targeted isolation of antibiotic resistant human gut bacteria. *PLoS ONE.* 2019;14(1):e0210970.
305. Van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, Kleerebezem M, De Vos WM, Thas O, et al. Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.* mai 2013;7(5):949-61.
306. Johansen CH, Bjerrum L, Finster K, Pedersen K. Effects of a *Campylobacter jejuni* infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. *Poult Sci.* avr 2006;85(4):579-87.
307. Schoeni JL, Wong AC. Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. *Appl Environ Microbiol.* avr 1994;60(4):1191-7.
308. Schoeni JL, Doyle MP. Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-*C. jejuni* metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 1 févr 1992;58(2):664-70.
309. Cheung SG, Goldenthal AR, Uhlemann A-C, Mann JJ, Miller JM, Sublette ME. Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. *Front Psychiatry.* 2019;10:34.
310. Samaranayake YH, Bandara HMHN, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung SKW, Samaranayake LP. Enteric Gram-negative bacilli suppress *Candida* biofilms on Foley urinary catheters. *APMIS.* janv 2014;122(1):47-58.
311. Park SJ, Han K-H, Park JY, Choi SJ, Lee K-H. Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*. *Yonsei Med J.* mars 2014;55(2):449-58.
312. Cabral DJ, Penumutthu S, Norris C, Morones-Ramirez JR, Belenky P. Microbial competition between *Escherichia coli* and *Candida albicans* reveals a soluble fungicidal factor. *Microb Cell.* 5(5):249-55.
313. Felipe I, Bochio EE, Martins NB, Pacheco C. Inhibition of macrophage phagocytosis of *Escherichia coli* by mannose and mannan. *Braz J Med Biol Res.* 1991;24(9):919-24.
314. Kirillov DA, Perunova NB, Chelpachenko OE, Elagina NN, Valyshev AV, Bukharin OV. [Modifying action of *Saccharomyces boulardii* on the biological properties of enterobacteria]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* août 2002;(4):57-9.
315. Wang K, Wang X, Ge X, Tian P. Heterologous Expression of Aldehyde Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Klebsiella pneumoniae* for 3-Hydroxypropionic Acid Production from Glycerol. *Indian J Microbiol.* sept 2012;52(3):478-83.
316. Ohsugi M, Noda H, Muro K, Ishiba A, Kondo Y, Nakao S. Effects of the yeast extract components pyrroloquinoline quinone and aspartic acid on vitamin B12 production in *Klebsiella pneumoniae* IFO 13541. *J Nutr Sci Vitaminol.* déc 1989;35(6):661-5.

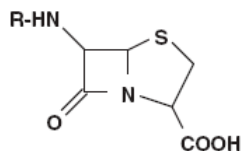
317. Harima HA, Mendes NF, Mamizuka EM, Mariano M. Effect of glucan on murine lupus evolution and on host resistance to *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1997;11(3):175-8.
318. d'Humières C, Touchon M, Dion S, Cury J, Ghozlane A, Garcia-Garcera M, et al. A simple, reproducible and cost-effective procedure to analyse gut phageome: from phage isolation to bioinformatic approach. *Sci Rep*. 5 août 2019;9(1):11331.
319. Kim SG, Becattini S, Moody TU, Shliaha PV, Littmann ER, Seok R, et al. Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature*. août 2019;572(7771):665-9.
320. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Garidou L, Pomié C, Courtney M, et al. Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. *Diabetes Obes Metab*. sept 2013;15 Suppl 3:61-70.
321. Hart ML, Meyer A, Johnson PJ, Ericsson AC. Comparative Evaluation of DNA Extraction Methods from Feces of Multiple Host Species for Downstream Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0143334.
322. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nature Biotechnology* [Internet]. 2 oct 2017 [cité 8 nov 2017]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.3960>
323. Tedjo DI, Jonkers DMAE, Savelkoul PH, Masclee AA, van Best N, Pierik MJ, et al. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126685.
324. Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, et al. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol*. 30 juill 2012;12:158.
325. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*. juill 2018;16(7):410-22.
326. Nilsson RH, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P, Tedersoo L. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*. févr 2019;17(2):95-109.
327. D'Amore R, Ijaz UZ, Schirmer M, Kenny JG, Gregory R, Darby AC, et al. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* [Internet]. déc 2016 [cité 21 févr 2018];17(1). Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/17/55>
328. Eisenstein M. An ace in the hole for DNA sequencing. *Nature*. 11 oct 2017;550(7675):550285a.
329. Schwartz MH, Wang H, Pan JN, Clark WC, Cui S, Eckwahl MJ, et al. Microbiome characterization by high-throughput transfer RNA sequencing and modification analysis. *Nature Communications* [Internet]. déc 2018 [cité 19 déc 2018];9(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-07675-z>
330. Liu Z, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research*. 6 sept 2008;36(18):e120-e120.
331. Balvočiūtė M, Huson DH. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*. mars 2017;18(S2):114.

332. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* déc 2014;15(12):550.
333. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 24 juin 2011;12(6):R60.
334. Milshteyn A, Colosimo DA, Brady SF. Accessing Bioactive Natural Products from the Human Microbiome. *Cell Host Microbe.* 13 2018;23(6):725-36.
335. Greub G. Culturomics: a new approach to study the human microbiome. *Clinical Microbiology and Infection.* déc 2012;18(12):1157-9.
336. Lagier J-C, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology.* 7 nov 2016;1:16203.
337. Jansson JK, Baker ES. A multi-omic future for microbiome studies. *Nat Microbiol.* 26 2016;1:16049.
338. Blanco-Míguez A, Fdez-Riverola F, Sánchez B, Lourenço A. Resources and tools for the high-throughput, multi-omic study of intestinal microbiota. *Briefings in Bioinformatics [Internet].* 27 nov 2017 [cité 15 déc 2017]; Disponible sur: <http://academic.oup.com/bib/advance-article/doi/10.1093/bib/bbx156/4665692>
339. Mallick H, Ma S, Franzosa EA, Vatanen T, Morgan XC, Huttenhower C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. *Genome Biology [Internet].* déc 2017 [cité 15 déc 2017];18(1). Disponible sur: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1359-z>
340. Kumar M, Ji B, Zengler K, Nielsen J. Modelling approaches for studying the microbiome. *Nat Microbiol.* août 2019;4(8):1253-67.
341. Raman AS, Gehrig JL, Venkatesh S, Chang H-W, Hibberd MC, Subramanian S, et al. A sparse covarying unit that describes healthy and impaired human gut microbiota development. *Science.* 12 2019;365(6449).
342. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science.* 6 sept 2013;341(6150):1241214-1241214.
343. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metabolism.* août 2015;22(2):228-38.
344. Subramanian S, Huq S, Yatsunenko T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature.* juin 2014;510(7505):417-21.

Annexes

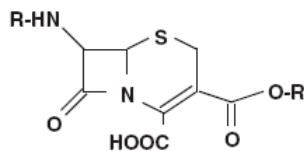
Annexe 1. Structure chimique des principales β -lactamines et inhibiteurs de β -lactamase (Nordmann *et al.*, 2012).

β -lactams



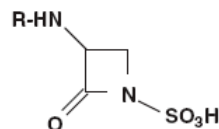
Penicillins

Penicillin G (e.g. benzpenicillin)
 Penicillin V (e.g. Phenoxymethylpenicillin)
 Penicillin M (e.g. Oxacillin, Cloxacilline)
 Aminopenicillins (e.g. Amoxicillin)
 Carboxypenicillins (e.g. Ticarcillin)
 Ureidopenicillins (e.g. Piperacillin)
 Aminidopenicillins (e.g. Pivmecillinam)



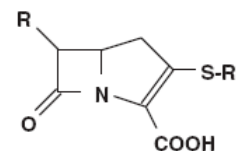
Cephalosporins

1st generation (e.g. Cefalotin)
 2nd generation (e.g. Cefoxitin, Cefuroxime)
 3rd generation (e.g. Cefotaxime, Ceftazidime)
 4th generation (e.g. Cefepime, Cefpirome)



Monobactam

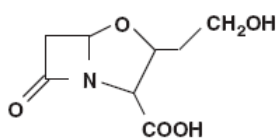
Aztreonam



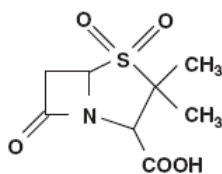
Carbapenems

Imipenem
 Meropenem
 Ertapenem
 Doripenem

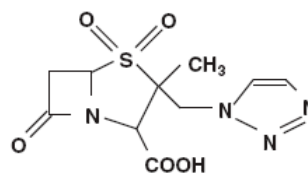
β -lactamase inhibitors



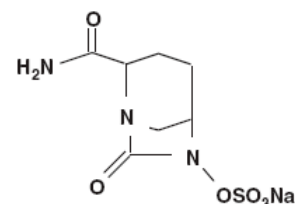
Clavulanic acid



Sulbactam



Tazobactam



NXL-104

TRENDS in Molecular Medicine

Annexe 2. Article de revue systématique publié dans Critical Care

Lors de la recherche bibliographique pour cette thèse, nous avons réalisé une revue systématique évaluant les arguments sur lesquels est fondé le dépistage systématique de la colonisation digestive à E-BLSE. Nous discutons l'apport de ce dépistage pour la mise en place de mesures d'hygiène, pour l'optimisation du traitement probabiliste des infections survenant chez les patients colonisés et pour l'indication des mesures éventuelles de décontamination digestive.

RESEARCH

Open Access



Is systematic fecal carriage screening of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* still useful in intensive care unit: a systematic review

Renaud Prevel^{1,2,6*} , Alexandre Boyer¹, Fatima M'Zali², Agnès Lasheras³, Jean-Ralph Zahar⁴, Anne-Marie Rogues^{3,5} and Didier Gruson¹

Abstract

Background: Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) are disseminating worldwide leading to increased hospital length of stay and mortality in intensive care units (ICU). ESBL-E dissemination was first due to outbreaks in hospital settings which led to the implementation of systematic fecal carriage screening to improve hygiene procedures by contact precautions. ESBLs have since spread in the community, and the relevance of contact precautions is questioned. ESBL-E dissemination led to an overuse of carbapenems triggering the emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Empirical antimicrobial therapy based on ESBL-E fecal carriage has been proposed but is debated as it could increase the consumption of carbapenems among ESBL-E carriers without any clinical benefit. Finally, selective decontamination among ESBL-E fecal carriers is evoked to decrease the risk for subsequent ESBL-E infection, but its efficacy remains debated. We propose to systematically review the evidence to recommend or not such systematic ESBL-E fecal carriage screening in adult ICU.

Methods: Every article focusing on ESBL-E and ICU available on the MEDLINE database was assessed. Articles were included if focusing on cross-transmission, efficacy of hygiene procedures, link between ESBL-E colonization and infection or guidance of empirical therapy or selective decontamination efficacy.

Results: Among 330 articles referenced on PubMed, 39 abstracts were selected for full-text assessment and 25 studies were included. Systematic screening of ESBL-E fecal carriage to guide contact precautions do not seem to decrease the rate of ESBL-E cross-transmission. It has a very good negative predictive value for subsequent ESBL-E infections but a positive predictive value between 40 and 50% and so does not help to spare carbapenems. Cessation of ESBL-E carriage systematic screening could decrease the use of carbapenems in ICU without any clinical harm. Nevertheless, further studies are needed to validate these results from monocentric before-after study. Selective decontamination strategy applied to ESBL-E fecal carriers could be helpful, but available data are conflicting.

Conclusion: Current knowledge lacks of high-quality evidence to strongly recommend in favor of or against a systematic ESBL-E fecal carriage screening policy for ICU patients in a non-outbreak situation. Further evaluation of selective decontamination or fecal microbiota transplantation among ESBL-E fecal carriers is needed.

Keywords: Extended-spectrum beta-lactamase, Carriage, Screening, Intensive care, Cross-transmission, Nosocomial infections

* Correspondence: renaud.prevel@hotmail.fr

¹CHU Bordeaux, Medical Intensive Care Unit, Pellegrin Hospital, F-33000 Bordeaux, France

²UMR 5234 CNRS, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The increasing antimicrobial resistance remains a major threat worldwide [1]. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) fecal carriage is increasing, especially in long-term care facilities and ICU [2–4]. The ESBL-E dissemination is of paramount importance since ESBL-E infections lead to increased healthcare costs, length of stay and mortality [5–8]. ESBL-E dissemination was first due to clonal outbreaks in hospital settings of TEM- and SHV-producing *Enterobacteriaceae*, and cross-transmission was highly involved in the outbreaks in ICU leading to the enforcement of hygiene procedures [9–11]. Systematic ESBL-E fecal carriage screening in ICU has been proposed as a standard of care by some societies as the provided information was thought to be useful to guide hygiene procedures [9]. More recently, ESBL gene epidemiology has been totally overhauled by the emergence of CefoTaXimase-München (CTX-M) enzymes which became the most predominant ESBL type worldwide in the early 2000s [12]. Contact precautions were still recommended for hospitalized ESBL-E fecal carriers to prevent nosocomial spread [13]. Therefore, systematic ESBL-E fecal carriage screening at admission was still considered as a standard of care to reduce guide contact precautions and decrease the incidence of hospital-onset ESBL-E clinical isolates [14, 15]. Unfortunately, despite those precautions, a steady increase of ESBL-E rate has been reported in hospital settings but also in the community which can range from 1–6% in Europe and North America to 60% in India [2, 16]. The paradigm of ESBL-E dissemination occurring only in hospital settings by clonal outbreaks has been dramatically changed with the ESBL-E dissemination now occurring everywhere, both in community and hospital settings, enhancing the need for further evaluation of contact precautions' efficacy.

Another interest of systematic screening of ESBL-E fecal carriage in ICU could also be to guide the empiric treatment of ICU-acquired infections. In fact, this treatment is often challenging, and carbapenems have emerged as the gold standard as they are almost always active on ESBL-E. However, carbapenems use leads to the emergence of *Enterobacteriaceae* resistant to carbapenems including non-fermenting Gram-negative, which cause almost half of culture-positive ventilator-associated pneumonia (VAP) in ESBL-E carriers [17–19]. As a consequence, alternative strategies to spare carbapenems are urgently needed [20]. ESBL-E fecal carriage has been suggested as a tool to guide the prescription of carbapenems for empiric antimicrobial therapy because of the suspected link between colonization and infection. Nevertheless, the predictive value of ESBL-E fecal carriage for helping the clinician to tailor the empirical antimicrobial therapy and its impact on the use of carbapenems is still a matter of debate.

Systematic fecal carriage screening of ESBL-E could also help to guide decolonization procedures. As a matter of fact, gut microbiota is now considered as the main source of ESBL-E dissemination [21]. Changes in the composition of the gut flora, due in particular to antibiotics and critical illness, can happen silently, leading to the selection of highly resistant bacteria including ESBL-E which can remain for months in the gut of the carrier without causing any symptoms or translocate through the gut epithelium, induce healthcare-associated infections, undergo cross-transmission to other individuals, and cause limited outbreaks. However, data about gut microbiota modulation (by selective decontamination or by fecal microbiota transplantation (FMT)) to eradicate ESBL-E fecal carriage are scarce.

We propose here to systematically review the evidence to recommend or not such systematic ESBL-E fecal carriage screening in ICU regarding the guidance of hygiene procedures, of empirical antimicrobial therapy for ICU-acquired infections and of selective decontamination strategy.

Methods

Search strategy

We searched the MEDLINE database for English language articles published from the inception of the database to February 15, 2019. A combination of MeSH/Emtree and title/abstract keywords was used. The search terms were “ESBL,” “ESBL-E,” “ESBLE,” “extended spectrum beta-lactamase,” “ICU” with non-relevant terms “neonatal,” “pediatric,” “children,” and “infants”.

Eligibility criteria

Studies were considered suitable for inclusion in this systematic review if (1) they enrolled ICU ESBL-E fecal carriers in a non-outbreak situation, (2) they assess the rate of ESBL-E cross-transmission in ICU, (3) they evaluate the efficacy of contact precautions to limit the spread of ESBL-E, (4) they assess the link or the prognostic value of ESBL-E carriage for subsequent ESBL-E infection, (5) they assess the efficacy of selective decontamination strategy to limit subsequent ESBL-E cross-transmission or infection, (6) all the patients were adults, and (7) they were written in English. If the studies lacked outcome data or provided only the prevalence of ESBL-E colonization or infection, they were excluded. If the full text could not be retrieved or if the article was a commentary or a review or an *erratum*, it was excluded.

Selection of studies and data extraction

All the available data were extracted from each study by two investigators (DG and RP) independently according to the aforementioned inclusion criteria, and any differences were resolved by discussion with a third investigator (JRZ). The following data were collected from each

study: the name of the first author, publication year, study design, number of patients, primary outcome, and risk factors for the primary outcome.

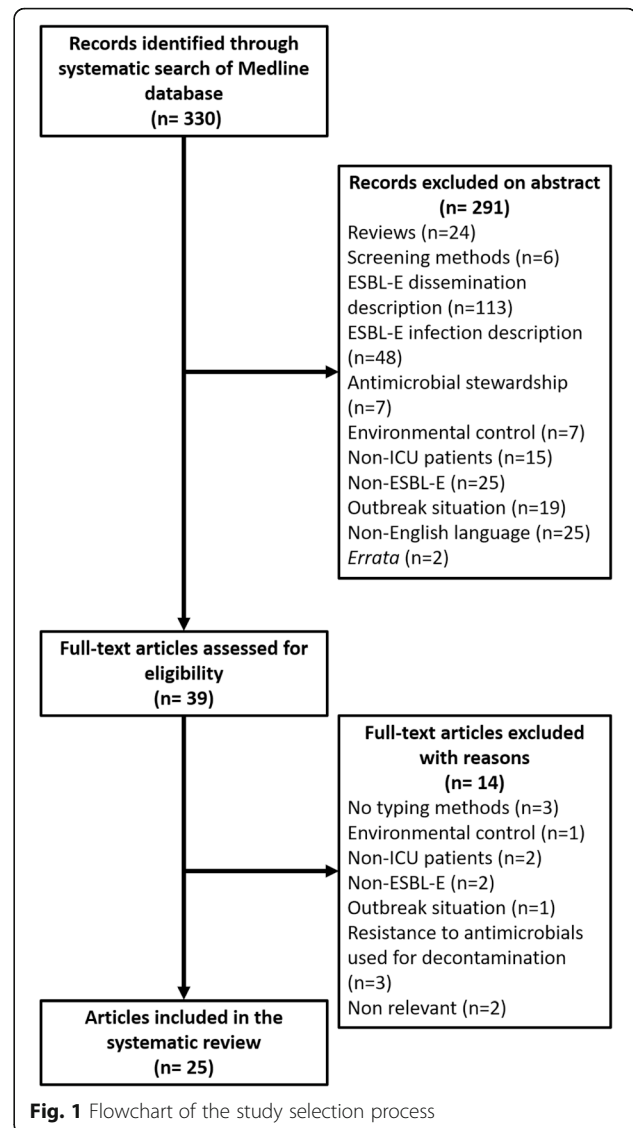
Results

Study selections

Using the previously described request in MEDLINE database, 330 articles were referenced. Every abstract was read and 39 articles that appeared to address issues relevant for this review were selected for full-text assessment. After full-text assessment, 25 studies were included in the systematic review (Fig. 1). Seven were relevant regarding the risk of ESBL-E cross-transmission (Table 1), 4 regarding the evaluation of hygiene procedures' efficacy (Table 2), 10 assessed the link between colonization and infection or the prognostic value of ESBL-E carriage to guide the empirical antimicrobial therapy (Table 3), and 4 the efficacy of a selective decontamination strategy (SD) (Table 4).

ESBL-E fecal carriage and the risk of cross-transmission in ICU in a non-outbreak situation

The first study demonstrating ICU ESBL-E cross-transmission in a non-outbreak situation describes two clones responsible for clusters of 5 and 12 patients. Nevertheless, this study included patient in 1990 and 1991 and did not focused on carriage but infection [22]. Another study involved 2883 patients with 28 (0.97%) ESBL-E carriers. Only 9/28 cases of ESBL-E were explained by cross-transmission despite the fact that the screening method was suboptimal limiting their impact on the prevention of ESBL-E dissemination [23]. These results were consistent with another one detecting 97/1806 (5%) of ESBL-E fecal carriers including 23/97 (24%) of ICU-acquired ESBL-producing *E. coli* fecal carriage with only 3/23 (13%) acquisitions likely to be due to cross-transmission [24]. Similar results were demonstrated even in a higher prevalence situation (ESBL-E carriage at admission: 98/347 (28.2%)), with an acquisition rate of 12.1% (11/91) without any case of cross-transmission [25]. Another study based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), revealed two cases of suspected cross-transmission for *E. coli* and two for *E. cloacae* in a setting with 50/316 (15.8%) of ESBL-E fecal carriage from patients on the liver transplantation, ICU, and hematology/oncology wards. Nevertheless, only one case of suspected cross-transmission (*E. cloacae*) occurred in ICU [26]. In other studies, cross-transmission has also been shown to be a rare event (5% of ESBL-E acquisition) [27], even in an ICU with no single room [28]. The occurrence of ESBL-E acquisition despite limited cross-transmission suggests limits to hygiene procedure efficacy in controlling ESBL-E dissemination in a non-outbreak situation and other mechanisms of dissemination which we still have to investigate.



ESBL-E fecal carriage and hygiene procedures in a non-outbreak situation

A large multicenter study in 13 European ICU testing the effect of rapid screening and isolation of carriers with contact precautions did not find any impact on ESBL-E acquisition, but the study was led in the context of a sustained high level of compliance to hand hygiene and chlorhexidine bathings [29]. In another study, cessation of contact isolation procedures had no independent impact on ESBL-E infections (adjusted OR 1.16, 95% CI 0.38–3.50, $p = 0.79$) nor on in-ICU death (SHR 1.22, 95% CI 0.93–1.59, $p = 0.15$) [30]. These results were consistent with a previous study which found that discontinuing contact precautions did not increase ICU-acquired ESBL-E fecal carriage (incidence densities respectively during contact vs standard precautions: 2.7 (95% CI 1.78–3.62) and 2.06 (95% CI 1.27–2.86) per 1000 patient-days; $p = 0.004$ for non-inferiority) in an

Table 1 Low level of ICU ESBL-E cross-transmission in a non-outbreak situation

Year	Authors	Design	N	Outcome	Brief results
2017	Repešé et al. [28]	Cohort study	470	ESBL-E fecal carriage Cross-transmission assessed by epidemiology and ESBL gene sequencing	62/470 (13.2%) of imported ESBL-E fecal carriage 9/221 (4.1%) of acquired ESBL-E fecal carriage 2/9 acquisitions were likely to be due to cross-transmission
2016	Alves et al. [27]	Cohort study	309	ESBL-E fecal carriage Cross-transmission assessed by epidemiology, rep-PCR and plasmid PCR	25/309 (8%) of imported ESBL-E fecal carriage 19/309 (6.5%) of acquired ESBL-E fecal carriage 1/19 acquisition was likely to be due to cross-transmission
2015	O'Connell et al. [26]	Cohort study	316	ESBL-E fecal carriage Cross-transmission assessed by epidemiology and PFGE	50/316 (15.8%) of ESBL-E fecal carriage 2 cases of suspected cross-transmission for <i>E.coli</i> and 2 for <i>E. cloacae</i> but only 1 (<i>E. cloacae</i>) occurred in ICU
2014	Kim J et al. [25]	Cohort study	347	Acquisition of ESBL-E by epidemiology and PFGE	98/347 (28.2%) of imported ESBL-E fecal carriage 11/91 (12.1%) of acquired ESBL-E fecal carriage in ICU No case of cross-transmission
2007	Harris et al. [24]	Cohort study	1806	Acquisition of ESBL-producing <i>E. coli</i> by epidemiology and PFGE	97/1806 (5%) of ESBL-E fecal carriers including as follows: 23/97 (24%) of acquired ESBL-producing <i>E. coli</i> fecal carriage 3/23 (13%) acquisitions were likely to be due to cross-transmission
2004	Thouvez et al. [23]	Cohort study	2883	Acquisition of ESBL-E by epidemiology and PFGE	9/28 cases of ESBL-E acquisition explained by cross-transmission
1996	Gori et al. [22]	Cohort study	8640	Acquisition of ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i> by antibiotic type, plasmid content, PFGE, and RAPD	45/8640 (0.5%) ESBL-E fecal carriage 4 ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i> clonal groups among which 2 are associated with clusters of cross-infection involving 5 and 12 patients

ESBL-E extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, ICU intensive care unit, PFGE pulsed-field gel electrophoresis, RAP rapid amplified polymorphic DNA, rep-PCR repetitive-element polymerase chain reaction

ICU with single rooms with dedicated equipment, strict application of hand hygiene, medical and paramedical leadership, and good antibiotic stewardship. [31].

A cost-effectiveness analysis showed that an improved compliance with hand hygiene is the most cost-saving strategy to prevent the transmission of ESBL-E. Screening

and cohorting had comparable effectiveness but were more expensive; screening and contact precautions were the least effective strategy [32].

To summarize, these results together suggest that cross-transmission does not seem any more to be the main source of ESBL-E acquisition in ICU. Moreover, a

Table 2 Efficacy of contact precautions on ICU ESBL-E dissemination in a non-outbreak situation

Year	Authors	Design	N	Outcome	Brief results
2018	Jalalzai et al. [30]	Unicentric, retrospective, uncontrolled before-and-after study	524 SCP 545 non-SCP with SP	ICU-acquired ESBL-E infections ICU deaths	No independent impact on ESBL-E infections of cessation of admission screening (adjusted OR 1.16, 95% CI 0.38–3.50, $p = 0.79$) nor on in-ICU death (SHR 1.22, 95% CI 0.93–1.59, $p = 0.15$)
2017	Kardas-Stoma et al. [32]	Cost-effectiveness analysis	NA	ICU-acquired ESBL-E fecal carriage ICU-acquired ESBL-E infections	Universal screening and contact precautions for ESBL-E fecal carriers vs base care, per 100 admissions 12 vs 15 ICU-acquired ESBL-E fecal carriage 4 vs 5 ICU-acquired ESBL-E infections
2017	Renaudin et al. [31]	Prospective non-inferiority before-and-after study	1547 CP 1577 SP	ICU-acquired ESBL-E fecal carriage	Incidence densities respectively during CP and SP: 2.7 (95% CI 1.78–3.62), 2.06 (95% CI 1.27–2.86) per 1000 patient-days; $p = 0.004$ for non-inferiority
2014	Derde et al. [29]	Prospective, randomized, interrupted, time series study	8501	ICU-acquired ESBL-E fecal carriage with and without CP	Incidence rate ratio: 0.994 (0.968–1.021; $p = 0.66$) comparing with and without CP

CP contact precautions, HH hand hygiene, ICU intensive care unit, PFGE pulsed-field gel electrophoresis, rep-PCR repetitive-element Polymerase chain reaction, SP standard precautions, SCP screening period

Table 3 Evaluation of ESBL-E fecal carriage to tailor empirical antimicrobial therapy

Year	Authors	Design	N	Outcome	Brief results
2018	Jalalzai et al. [30]	Monocentric, retrospective, before-and-after study	524 SCP 545 non-SCP	Carbapenem consumption	Decrease in carbapenem exposure in patients without ESBL-E infection during the non-SCP (75 vs 61 carbapenem-days per 1000 patient-days, $p = 0.01$)
2018	Barbier et al. [39]	Inception cohort of a multicenter prospective database	318	ESBL-E VAP	18 ESBL-E VAP for 361 (5%) ventilator-associated complications among ESBL-E fecal carriers
2018	Houard et al. [40]	Monocentric, retrospective cohort study	410	ESBL-E VAP	Previous ESBL-E fecal carriage as the only independent risk factor [OR 23; 95% CI (10–55), $p < 0.001$] Predictive value of ESBL-E fecal carriage for subsequent ESBL-E VAP: PPV 43.6%, NPV 97.3%
2018	Liu et al. [35]	Monocentric, retrospective nested case-control study	9015	ICU-acquired ESBL-E BSI	42 ESBL-E BSI among 9015 ESBL-E fecal carriers (0.5%) Independent risk factors associated with subsequent ESBL-E BSI: Antibiotic in the past 72 h: Penicillin (OR 12.076; 95% CI 1.397–104.251, $p 0.024$) Cephalosporin (OR 6.900; 95% CI 1.493–31.852, $p 0.013$) Carbapenem (OR 5.422; 95% CI 1.228–23.907, $p 0.026$) Previous ICU stay (OR 1.041; 95% CI 1.009–1.075, $p 0.012$) Maximum body temperature (OR 8.014; 95% CI 2.408–26.620, $p 0.001$)
2017	Razazi et al. [37]	Monocentric, prospective cohort study	6303	ICU-acquired ESBL-E pneumonia Predictive factors for ESBL-E pneumonia among carriers	48/843 (6%) ESBL-E fecal carriers has subsequent ICU-acquired ESBL-E pneumonia 48/111 (43%) of ICU-acquired pneumonia among ESBL-E fecal carriers were due to ESBL-E SAPSI at admission > 43 [OR 2.81 (1.16–6.79)] Colonization with <i>Enterobacter</i> sp. or <i>K. pneumoniae</i> [OR 10.96 (2.93–41.0)] Receipt of > 2 days of AMC [OR 0.24 (0.08–0.71)]
2017	Carbonne et al. [38]	Multicenter, retrospective cohort study	1503	ESBL-E pulmonary colonization	ESBL-E fecal carriage predictive values for ESBL-E pulmonary colonization: Early (≤ 5 days): NPV 99.2% (95% CI [98.7;99.6]), PPV 14.5% (95% CI [12.8;16.3]) Late (> 5 days): NPV 93.4% (95% CI [91.9;95.0]), PPV 34.4% (95% CI [31.4;37.4])
2016	Barbier et al. [41]	Cause-specific hazard model based on prospective data	16,374	ICU-acquired ESBL-E infection Carbapenem exposure	98/594 (16.4%) ESBL-E fecal carriers had subsequent ICU-acquired ESBL-E infection 627, 241 and 69 carbapenem-days per 1000 patient-days for respectively infected ESBL-E carriers, non-infected ESBL-E carriers and non ESBL-E carriers
2016	Bruyère et al. [19]	Monocentric, retrospective cohort study	587	ESBL-E VAP	ESBL-E fecal carriage predictive values for ESBL-E VAP: PPV 41.5%, NPV 99.4%
2012	Razazi et al. [34]	Monocentric, prospective, cohort study	610	ICU-acquired ESBL-E infection	10% of the first episodes of ICU-acquired infections are due to ESBL-E 27% of the second episodes of ICU-acquired infections are due to ESBL-E
2006	Martins et al. [36]	Monocentric prospective cohort study	231	ICU-acquired ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i> pneumonia	Previous ESBL-production <i>K. pneumoniae</i> is an independent risk factor ICU-acquired ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i> pneumonia (OR 60.6; 95% CI 56.33–578.73)

AMC amoxicillin/clavulanic acid, BSI bloodstream infection, ESBL-E extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, ICU intensive care unit, NPV negative predictive value, PPV predictive positive value, SCP screening period, SAPSI/ Simplified Acute Physiology Score II, VAP ventilator-associated pneumonia

Table 4 Efficacy of selective decontamination for ESBL-E fecal carriage among ICU patients

Year	Authors	Design	Decontamination	N	Outcome	Brief results
2018	Wittekamp et al. [46]	Randomized controlled trial	CHX 2% SOD by mouthpaste (colistin, tobramycin, nystatin) SDD by the same mouthpaste and gastrointestinal suspension)	8665	ICU-acquired ESBL-E BSI	aHR vs baseline: CHX 1.13 (95% CI 0.68–1.88) SOD 0.89 (95% CI 0.55–1.45) SDD 0.70 (95% CI 0.43–1.14)
2016	Camus et al. [44]	Observational Before-after	SDD by as follows: Colistin Tobramycin Amphotericin B	5250	Rates of acquired infections caused by AGNB Rates of ESBL-E fecal carriage acquisition	Diminution of the incidence rate of acquired infections caused by AGNB (1.59 vs 5.43 per 1000 patient-days, $p < 0.001$) Diminution of the acquisition rate of ESBL-E fecal carriage (OR = 0.94 [0.88–1.00], $p = 0.04$)
2005	Troché et al. [43]	Prospective observational cohort study	SDD by 2 among the following: Erythromycin Neomycin Polymyxin E	2235	Rates of ESBL-E fecal carriage acquisition	Diminution of the acquisition rate of ESBL-E fecal carriage from 5.5 cases per 1000 patient-days during the first 3 years to 1.9 cases during the last 3 years ($p < 0.05$)
1998	Decré et al. [45]	Prospective controlled cohort study	SDD by as follows: Erythromycin Polymyxin E	65	Incidence and infection with ESBL- <i>K. pneumoniae</i>	Selective digestive decolonization failed to reduce the incidence of acquisition of ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i>

AGNB multidrug-resistant aerobic Gram-negative bacilli, aHR adjusted Hazard ratio, BSI bloodstream infection, CHX chlorhexidine, SDD selective digestive decontamination, SOD selective oral decontamination

universal standard precaution strategy seems to be sufficient to control the risk of cross-transmission. The relevance of a systematic ESBL-E fecal carriage screening policy in ICU to guide hygiene procedures is now questioned (Additional file 1).

ESBL-E fecal carriage prognostic value for subsequent ICU-acquired ESBL-E infections in a non-outbreak situation

Another discussed interest of systematic screening of ESBL-E fecal carriage could be to guide empiric antimicrobial therapy in case of subsequent infection among carriers. The most investigated ICU-acquired infections are VAP and bloodstream infections (BSI) as they are the more frequent ones [33]. Among ESBL-E fecal carriers in ICU, one study found that 10% and 27% of first and second episodes of ICU-acquired infections [34] and another that even 40% of VAP are due to ESBL-E [19].

Regarding BSI, a recent study conducted in China found a proportion of 0.5% of ESBL-E fecal carriers developing subsequent ESBL-E BSI in ICU (42/9015). Independent risk factors associated with subsequent ESBL-E BSI were antibiotic use in the past 72 h (penicillin [OR 12.076; 95% CI 1.397–104.251, p 0.024], cephalosporin [OR 6.900; 95% CI 1.493–31.852, p 0.013], carbapenem [OR: 5422; 95% CI 1.228–23.907, p 0.026]), previous ICU stay (OR 1.041; 95% CI 1.009–1.075, p 0.012), and maximum body temperature (OR 8014; 95% CI 2.408–26.620, p 0.001) [35]. Nevertheless, as a case is diagnosed by a positive blood culture, antimicrobial therapy and maximum body temperature could only be the signal of the on-going infection with empiric treatment initiated as ESBL-E BSI are compared with non-infected ESBL-E fecal carriers.

Regarding risk factors for VAP, ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* was found to be an independent risk factor ICU-acquired ESBL-producing *K. pneumoniae* pneumonia (OR 60.6; 95% CI 56.33–578.73) [36]. Other identified independent risk factors for ESBL-E pneumonia among ESBL-E fecal carriers were SAPS II at admission > 43 [OR 2.81 (1.16–6.79)] and colonization with *Enterobacter* sp. or *K. pneumoniae* species [OR 10.96 (2.93–41.0)] whereas receipt of > 2 days of amoxicillin/clavulanic acid during the ICU stay was protective [OR 0.24 (0.08–0.71)] [37]. Despite these identified risk factors, individual prediction of subsequent ESBL-E VAP among ESBL-E fecal carriers remains difficult and prognostic values will be discussed thereafter.

Regarding ESBL-E pulmonary colonization, ESBL-E fecal carriage has an excellent negative predictive value (NPV) (99.2%, 95% CI [98.7,99.6] for ≤ 5 days and 93.4%, 95% CI [91.9,95.0] for > 5 days) despite a poor positive predictive value (PPV) (14.5% [95% CI 12.8, 16.3] and 34.4% [95% CI [31.4, 37.4)], for the early and late groups respectively [38].

Nevertheless, pulmonary colonization does not mean infection. A monocentric prospective study found 111 (13%) patients among 843 ESBL-E fecal carriers who developed ICU-acquired pneumonia of whom 48 (43%) had ESBL-E pneumonia (6% of carriers). Patients with ESBL-E pneumonia in this study had a higher SOFA score ($p = 0.037$) and more frequent septic shock at pneumonia onset ($p = 0.047$) than patients with pneumonia due to another germ [37]. Even if this article also identified risk factors, it remains very difficult to predict which patient will suffer from a ESBL-E VAP or not. Enhancing this result, an inception cohort of the prospective database OUTCOMEREA showed that infectious-related ventilator-associated complications

among ESBL-E fecal carriers mostly reflect non-VAP events (18/361, 13%) with only 18/361 (5%) ESBL-E VAP but that they are a major driver of carbapenem consumption [39]. Regarding predictive values, a retrospective monocentric study showed a 41.5% PPV and a 99.4% NPV [19]. Another study confirmed prior ESBL-E fecal carriage to be the only independent risk factor for subsequent ESBL-E VAP [OR 23 (95% CI 10–55)] with a PPV of 43.6% and a NPV of 97.3%. Duration of mechanical ventilation, length of ICU stays, and mortality rates (55.8% vs 50%, $p = 0.48$) were similar in ESBL-E VAP, compared with VAP due to other bacteria [40]. Because of these excellent NPV, some authors have suggested that systematic ESBL-E fecal carriage screening could help to limit the use of carbapenems, but this assertion is now contradicted.

Jalalzai et al. assessed carbapenem consumption after cessation of screening for intestinal carriage of ESBL-E during two consecutive 1-year period (with and without systematic screening with respectively 524 and 545 patients) [30]. An admission during the no-systematic screening period exerted no independent impact on the hazards of ESBL-E infections and in-ICU death. The exposure to carbapenems in patients without ESBL-E infection even decreased between the systematic screening and no-systematic screening periods (75 versus 61 carbapenem-days per 1000 patient-days, $p = 0.01$). These results are consistent with a prospective multicentric study revealing that ESBL-E infections are rather infrequent in carriers and that carbapenem exposure was increased among ESBL-E carriers without infection. ESBL-E carriers even without infections also had a delayed discharge, thereby amplifying the selective pressure and the colonization pressure in ICU [41].

To summarize, the link between ESBL-E colonization and subsequent ESBL-E infection seems to be real as consistently observed by several different teams. Nevertheless, subsequent ESBL-E infections are a rare event which is almost unpredictable. An empirical antimicrobial therapy guided on ESBL-E carriage status leads to an overconsumption of carbapenems without a clinical benefit. A systematic screening policy of ESBL-E fecal carriage in ICU to guide empirical antimicrobial therapy is now questioned. Further studies are needed to better understand the link between colonization and infection and to assess if we can improve the prediction of subsequent ESBL-E infections. Disturbances of gut microbiota could be part of the explanation, and so selective decontamination has been evoked as a tool to modulate the gut microbiota and to eradicate multi-drug resistant bacteria fecal carriage [21, 42].

ESBL-E fecal carriage and selective decontamination in ICU in a non-outbreak situation

One prospective observational cohort study in a surgical ICU of a tertiary teaching hospital using 2 antibiotics among erythromycin, neomycin, or polymyxin E in 37

ESBL-E fecal carriers (2235 patients included) suggested a diminution of the acquisition rate of ESBL-E fecal carriage from 5.5 cases per 1000 patient-days during the first 3 years to 1.9 cases during the last 3 years ($p < 0.05$) but it was a secondary outcome [43]. Additionally, an observational single-center study found a diminution of the incidence rate of acquired infections caused by multidrug-resistant aerobic Gram-negative bacilli (1.59 vs 5.43 per 1000 patient-days, $p < 0.001$) and a diminution of the acquisition rate of ESBL-E fecal carriage (OR = 0.94 [0.88–1.00], $p = 0.04$) [44]. Another prospective controlled cohort study with decolonization by erythromycin and polymyxin E concluded that selective digestive decolonization (SDD) failed to reduce the incidence of acquisition of ESBL-producing *K. pneumoniae* [45]. Nevertheless, these studies did not assess the efficacy of SDD especially for the ESBL-E carriers. A recent multicenter prospective study including 8665 patients compared the efficacy of chlorhexidine 2% vs selective oral decontamination (SOD) by mouthpaste (colistin, tobramycin, nystatin) vs SDD by the same mouthpaste and gastrointestinal suspension to prevent ESBL-E bloodstream infections but among every ventilated patients in ICU and not only ESBL-E carriers. Compared to baseline care, they did not find any strategy to be efficient (adjusted hazard ratios: CHX 1.13 (95% CI 0.68–1.88), SOD 0.89 (95% CI 0.55–1.45), SDD 0.70 (95% CI 0.43–1.14) [46].

Because of the lack of high-quality evidence of selective decontamination efficacy (oral and/or digestive) and concerns about the emergence of resistance to the antimicrobials used, European guidelines recommend against decolonization strategies for ICU ESBL-E fecal carriers and call for more research [47]. According to current knowledge, it does not seem relevant to have a systematic ESBL-E fecal carriage screening policy to guide selective decontamination strategy as ESBL-E gut decolonization by antibiotics are not validated and so not recommended. Nevertheless, the impact of SDD on ESBL carriage was only evaluated in studies performed in western countries. This field seems to be helpful and should be better explored.

Discussion

A universal standard precaution strategy seems to be sufficient to control the risk of ESBL-E cross-transmission even in ICU. A systematic screening policy to guide contact precautions does not appear to be useful and cost-effective. Therefore, it should be kept in mind that the studies reported here assessed a non-outbreak situation in western countries. A study assessing the ESBL-E respiratory colonization in Sri Lanka suggested a higher cross-transmission rate but no data are provided about the imported or acquired status of ESBL-E colonization [48]. Further studies are needed to assess the rate of cross-transmission and the efficacy of hygiene procedures in non-western countries which have a higher prevalence

of ESBL-E [2, 16]. Moreover, the four studies presented in Table 2 have some methodological limitations even if they all draw the same conclusions without any increase in ESBL-E infections after cessation of contact precautions for strict standard precautions and that studies conducted in a non-ICU setting discussed thereafter conclude the same way.

Regarding the efficacy of hygiene procedures in non-ICU setting, a quasi-experimental study showed that contact precautions prevent from outbreaks but have no impact on nosocomial ESBL incidence in a non-outbreak situation [49]. Then, cessation of contact precautions for ESBL-producing *E.coli* was first demonstrated to be safe among non-ICU hospitalized patients in double-bed rooms with another patient colonized or infected with an ESBL-E [50] and was confirmed by the absence of cross-transmission with the respect of the sole standard hygiene precautions [51]. In addition, a study showed no difference between standard and contact precautions in the incidence of ESBL-E in hospital settings [52]. Besides the lack of efficacy, contact precautions are associated with adverse effects including patients' psychological distress or medical errors [53, 54]. Another point is that even if cross-transmission can be a cause of ESBL-E carriage acquisition, it remains a rare event in western countries ICU under strict hygiene procedures. For instance, even in a study with a large proportion of cross-transmission among ICU-acquired ESBL-E carriage acquisition (3/23, 13%), in fact only 3/1806 (0.17%) patients admitted in ICU during the study period experienced ESBL-E cross-transmission [24]. Moreover, even one case of cross-transmission will always be concerning and thorough standard procedures are absolutely needed.

Besides, the ability for spreading of the different species of *Enterobacteriaceae* could be variable with a special concern for *K pneumoniae*. Some authors suggest it could be 3.7 times more prone to cross-transmission than *E.coli* [55]. Nevertheless, the mathematical model assuming a 100% sensitivity and specificity for microbiological tests and the absence of interaction between *E. coli* and non-*E. coli* bacteria cannot be fully realistic and so limit the validity of these results. It remains also unclear if this difference of transmissibility relies on bacteria intrinsic virulence or patients' frailty. Colonization seems to occur in patients with many comorbidities, invasive procedures, and antimicrobial exposure, who have a higher colonizing inoculum leading to a possible increased risk of cross-transmission [56, 57]. Furthermore, cross-transmission was a rare event even for *K. pneumoniae* as reported previously [27, 28]. No data prove any difference between standard and contact precautions regarding *K. pneumoniae* cross-transmission [58].

Targeted screening was also studied because the risk of ESBL-E fecal carriage is not equal for every in-patient in ICU [59]. This targeted strategy has been confirmed

to be as efficient as the systematic one with exposure to antibiotics within the preceding 3 months, hospitalization within the preceding year, admission of another hospital department with a hospital stay of more than 5 days, immunosuppression, chronic dialysis, transfer from rehabilitation, long-term-care unit or nursing home, and travel abroad within 1 year as targeted risk factors. Results were consistent with those of another study which considered transfer from another unit or hospital as risk factors and did not find any association with more third-generation cephalosporin (3CG)-resistant infections (ESBL or production of cephalosporinase) [60]. Nevertheless, the targeted strategy has not been compared to the complete cessation of screening and there is so no proof of its relevance.

Even if the relevance of universal screening and of contact precautions is questioned, it should not be interpreted as a lax signal. Once again, high compliance with systematic standard precautions, especially hand hygiene, permanent surveillance of nosocomial ESBL-E infection outbreak, and antimicrobial stewardship are fully needed [61].

Treatment of subsequent infections

Several studies aimed to identify reliable risk factors to predict subsequent ESBL-E infections. In non-ICU patients, severity at admission and colonization with *Enterobacter* sp. or *K. pneumoniae*; referral from a medical ward, nursing home, or rehabilitation center; previous fluoroquinolone treatment; extracorporeal membrane oxygenation; and the absence of prior positive ESBL-E rectal swab culture were identified as risk factors [62]. Despite these identified risk factors, it remains difficult to predict which patient is infected with an ESBL-E or not, especially in ICU [39]. The effect of BLI use prior to infection among ESBL-E fecal carriers remains unclear [37, 63]. Available data focus on VAP and BSI as they are the most frequent ICU-acquired infections and as the distinction between urinary tract infection and urinary colonization in catheterized patients can be seriously challenging.

As described for the risk of transmission, *K. pneumoniae* could be at increased risk of subsequent infections in colonized patients compared with other *Enterobacteriaceae* [55, 56, 64]. Moreover, no significant difference in hospital mortality in non-ICU patients has been found between *E. coli* and *K. pneumoniae* (ESBL *E. coli* 23.8% vs ESBL *K. pneumoniae* 27.1%, $p = 0.724$) [65]. Once again, the role of the bacteria itself or of the host's condition is still unclear [56]. ESBL-E carriage, *a fortiori* for *K. pneumoniae*, could be a major reflection of the host frailty. The fact that adequate empirical therapy does not have a clear impact on ESBL-E infections contrary to the host's condition supports this hypothesis [66–69]. The more recent study on the field is the only randomized controlled trial available and did not manage to prove the non-inferiority of piperacillin-tazobactam

compared with meropenem for the treatment of BSI due to 3CG-resistant *E.coli* or *K. pneumoniae* [69]. Nevertheless, despite the quality of this study, some limitations apply to the conclusions of this study which should be interpreted cautiously [70]. Further studies are urgently needed to address this issue. Therefore, systematic carbapenem use among subsequently infected ESBL-E carriers could be questioned. In that case, main alternative candidates would be combinations such as piperacillin-tazobactam, new beta-lactams as ceftolozane-tazobactam or ceftazidime-avibactam, and combination with aminoglycosides [71–74]. Those strategies need to be validated but would allow carbapenems spare without the need of systematic ESBL-E fecal carriage screening.

Selective decontamination

Selective decontamination is an attractive approach but, as previously described, its efficacy for ESBL-E decontamination still needs to be proven. Moreover, some concerns are already raised about the emergence of resistance to used antimicrobials such as colistin and tobramycin [75–77]. One of these studies even showed the emergence of ESBL-E when 3CG are used for selective decontamination [77]. Regarding a non-ICU setting, the major study was a single-center trial with 54 ESBL-E carriers involved which assessed colistin and neomycin plus nitrofurantoin to successfully decolonize patients during the treatment but not 7 days after treatment cessation. Furthermore, no clinical outcome was reported [78].

Another approach to eradicate ESBL-E fecal carriage would be to cope with the effects of critical illness and antimicrobial therapy on gut. In fact, major gut microbiota modifications occur during hospitalization, *a fortiori* in ICU, and some of these modifications are associated ESBL-E fecal carriage [79, 80]. Cases of FMT to eradicate ESBL-E carriage have been reported [81, 82]. This approach is now being investigated in non-ICU patients. A proof-of-principle study included 15 patients to receive one FMT (among whom 7 received a second one) and suggested that FMT could be an effective treatment in patients carrying ESBL-E with several possible factors of response to therapy, such as donor-recipient microbiota match and number of FMTs [83]. A randomized, open-label, superiority trial in four tertiary care centers showed a non-significant decolonization success of 1.7 [95% CI 0.4–6.4] for a 5-day course of oral antibiotics followed by FMT, but the study failed to achieve the planned sample size for logistical and regulatory reasons making firm conclusions regarding efficacy difficult [84]. Moreover, fecal transplantation is not always well accepted by the patients and their siblings and concerns exist about gut permeability among critically ill patients [85]. A “soft decolonization” approach by probiotics could be a more feasible option. Nevertheless, this field

has to be considered with caution and remains controversial, since there are studies with some positive effects, but also many negative studies. A major limit of previous studies is that used probiotics were “ready-to-use.” A promising but still experimental approach is to tailor the probiotics by indication or even by patient. A first step forward is the identification of a four-bacteria consortium which eradicates gut colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a murine model [86]. Regarding ESBL-E colonization, a recent study identified *Bacteroides uniformis* as a possible candidate [87]. FMT and “soft decolonization” by tailored probiotics have to be further investigated and shown to be effective and safe among ICU patients before it can be used in routine. Therefore, systematic ESBL-E fecal carriage screening cannot be indicated to guide non-validated therapies.

Conclusions

Systematic ESBL-E fecal carriage screening in ICU and contact precautions have been set up to fight against ESBL-E outbreaks. In front of a changing paradigm from clonal outbreaks in health settings to a wide dissemination in the community, systematic ESBL-E screening could not be adequate anymore to guide contact precautions. Systematic and thorough standard precautions with hand hygiene appear to be the most efficient procedures even if studies providing higher level of evidence are warranted to strongly recommend in favor of or against systematic ESBL-E fecal carriage screening in ICU to guide hygiene procedures. Systematic ESBL-E fecal carriage screening seems to increase the consumption of carbapenems without improving the patients’ care and so does not seem to be beneficial as the overuse of carbapenems is associated with the expansion of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. The link between ESBL-E colonization and infection should be further investigated to better understand involved mechanisms. Selective decontamination could be a helpful approach to eradicate ESBL-E colonization, but its efficacy still needs to be demonstrated and concerns exist about the emergence of resistance to the antimicrobials used. New strategies for ESBL-E eradication modulating the gut microbiota such as FMT or a “soft decolonization” approach should be considered in future studies.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Factors questioning the relevance of systematic fecal carriage screening of ESBL-E. ESBL-E: extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. ICU: intensive care unit. (DOCX 98 kb)

Abbreviations

3CG: Third-generation cephalosporins; BLI: Beta-lactam/beta-lactamase inhibitor; BSI: Bloodstream infection; CTX-M: CefoTaXimase-München; E.

coli: *Escherichia coli*; ESBL-E: Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*; FMT: Fecal microbiota transplantation; ICU: Intensive care unit; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; NPV: Negative predictive value; PCR: Polymerase chain reaction; PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis; PPV: Positive predictive value; SDD: Selective digestive decontamination; SHV: SulphHydriyl variable; SOD: Selective oral decontamination; VAP: Ventilator-associated pneumonia

Funding

No specific funding has to be declared.

Availability of data and materials

PubMed database.

Authors' contributions

RP, JRZ, and DG wrote the manuscript. AL, AMR, FMZ, and AB reviewed the manuscript and made significant corrections. FMZ edited the English language. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

AL, AMR, FMZ, RP, JRZ, and DG declare that they have no competing interests. AB reports congress fees from Pfizer and Gilead and a symposium moderation for Basilea.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹CHU Bordeaux, Medical Intensive Care Unit, Pellegrin Hospital, F-33000 Bordeaux, France. ²UMR 5234 CNRS, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France. ³Univ. Bordeaux, CHU Bordeaux, Hygiène hospitalière, F-33000 Bordeaux, France. ⁴Unité INSERM - IAME UMR 1137, Université Paris-13, Bobigny, France. ⁵Univ. Bordeaux, Inserm, Bordeaux Population Health Research Center, team pharmacoepidemiology, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France. ⁶Bordeaux, France.

Received: 16 January 2019 Accepted: 26 April 2019

Published online: 14 May 2019

References

- Carlet J. The world alliance against antibiotic resistance: consensus for a declaration. *Clin Infect Dis*. 2015;60:1837–41.
- Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andreumont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:744–58.
- Flokas ME, Alevizakos M, Shehadeh F, Andreatos N, Mylonakis E. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* colonisation in long-term care facilities: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50:649–56.
- Nicolas-Chanoine M-H, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, Bert F, et al. 10-fold increase (2006–11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:562–8.
- Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti-Infect Ther*. 2013;11:321–31.
- Maslikowska JA, Walker SAN, Elligsen M, Mittmann N, Palmay L, Daneman N, et al. Impact of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella* species on outcome and hospitalization costs. *J Hosp Infect*. 2016;92:33–41.
- Esteve-Palau E, Solande G, Sánchez F, Sorlí L, Montero M, Güerri R, et al. Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* requiring hospitalization: a matched cohort study. *J Inf Secur*. 2015;71:667–74.
- Leistner R, Gürntke S, Sakellariou C, Denkel LA, Bloch A, Gastmeier P, et al. Bloodstream infection due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: an analysis of the disease burden in a large cohort. *Infection*. 2014;42:991–7.
- Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:1–55.
- March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A, Slegel F, et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:934–44.
- Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio*. 2013; 4 Available from: <http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00377-13>. [cited 2018 Oct 31].
- Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990;18:294–8.
- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. 2007 guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings. *Am J Infect Control*. 2007;35:565–164.
- Lowe CF, Katz K, McGeer AJ, Muller MP. For the Toronto ESBL working group. Efficacy of admission screening for extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. Kluytmans J, editor. *PLoS One*. 2013;8:e62678.
- Société française d'hygiène hospitalière (SF2H). Prévention de la transmission croisée: précautions complémentaires contact; 2009;XII. p. 81.
- Karantika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk factors among healthy individuals: a systematic review and metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 2016;63:310–8.
- Armand-Lefèvre L, Angebault C, Barbier F, Hamelet E, Defrance G, Ruppé E, et al. Emergence of imipenem-resistant Gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57: 1488–95.
- McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, Qi C, Bolon M, Scheetz MH. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:5131–3.
- Bruyère R, Vigneron C, Bador J, Aho S, Toitot A, Quenot J-P, et al. Significance of prior digestive colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in patients with ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*. 2016;44(4):699–706.
- Brettonnière C, Leone M, Milési C, Allaouchiche B, Armand-Lefèvre L, Baldesi O, et al. Strategies to reduce curative antibiotic therapy in intensive care units (adult and paediatric). *Intensive Care Med*. 2015;41:1181–96.
- Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012;1:39.
- Gori A, Espinasse F, Deplano A, Nonhoff C, Nicolas MH, Struelens MJ. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2448–53.
- Thouverez M, Talon D, Bertrand X. Control of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase in intensive care units: rectal screening may not be needed in non-epidemic situations. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25:838–41.
- Harris AD, Kotetishvili M, Shurland S, Johnson JA, Morris JG, Nemoy LL, et al. How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum β -lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Am J Infect Control*. 2007;35:97–101.
- Kim J, Lee JY, Kim SI, Song W, Kim J-S, Jung S, et al. Rates of fecal transmission of extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among patients in intensive care units in Korea. *Ann Lab Med*. 2014;34:20–5.
- O'Connell N, Keating D, Kavanagh J, Schaffer K. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in high-risk patients in an Irish tertiary care hospital. *J Hosp Infect*. 2015;90:102–7.
- Alves M, Lemire A, Decré D, Margetis D, Bigé N, Pichereau C, et al. Extended-spectrum beta-lactamase – producing enterobacteriaceae in the intensive care unit: acquisition does not mean cross-transmission. *BMC*

- Infect Dis. 2016;16 Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1489-z>. [cited 2018 Oct 31].
28. Repessé X, Artiguenave M, Paktoris-Papine S, Espinasse F, Dinh A, Charron C, et al. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in an intensive care unit with no single rooms. *Ann Intensive Care*. 2017;7 Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0295-0>. [cited 2018 Oct 31].
 29. Derde LPG, Cooper BS, Goossens H, Malhotra-Kumar S, Willems RJL, Gniadkowski M, et al. Interventions to reduce colonisation and transmission of antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: an interrupted time series study and cluster randomised trial. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:31–9.
 30. Jalalzai W, Boutrot M, Guinard J, Guigon A, Bret L, Poisson D-M, et al. Cessation of screening for intestinal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a low-endemicity intensive care unit with universal contact precautions. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24:429.e7–429.e12.
 31. Renaudin L, Llorens M, Goetz C, Gette S, Citro V, Poulain S, et al. Impact of discontinuing contact precautions for MRSA and ESBL in an intensive care unit: a prospective noninferiority before and after study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38:1342–50.
 32. Kardaš-Sloma L, Lucet J-C, Perozziello A, Pelat C, Birgard G, Ruppé E, et al. Universal or targeted approach to prevent the transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in intensive care units: a cost-effectiveness analysis. *BMJ Open*. 2017;7:e017402.
 33. Lepape A, Machut A, Savey A. Réseau national Réa-Raisin de surveillance des infections acquises en réanimation adulte - Méthodes et principaux résultats. *Méd Intensive Réanimation*. 2018;27:197–203.
 34. Razazi K, Derde LPG, Verachten M, Legrand P, Lesprit P, Brun-Buisson C. Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit. *Intensive Care Med*. 2012;38:1769–78.
 35. Liu M, Li M, Wu L, Song Q, Zhao D, Chen Z, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* septicemia among rectal carriers in the ICU: *Medicine* (Baltimore), vol. 97; 2018. p. e12445.
 36. Martins IS, Pessoa-Silva CL, Nouer SA, Pessoa de Araujo EG, Ferreira ALP, Riley LW, et al. Endemic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* at an intensive care unit: risk factors for colonization and infection. *Microb Drug Resist*. 2006;12:50–8.
 37. Razazi K, Mekontso Dessap A, Carteaux G, Jansen C, Decousser J-W, de Prost N, et al. Frequency, associated factors and outcome of multi-drug-resistant intensive care unit-acquired pneumonia among patients colonized with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Ann Intensive Care*. 2017;7 Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0283-4>. [cited 2018 Oct 31].
 38. Carbonne H, Le Dorze M, Bourrel A-S, Poupert H, Poyart C, Cambau E, et al. Relation between presence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in systematic rectal swabs and respiratory tract specimens in ICU patients. *Ann Intensive Care*. 2017;7 Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0237-x>. [cited 2018 Oct 31].
 39. for the OUTCOMEREA Study Group, Barbier F, Bailly S, Schwebel C, Papazian L, Azoulay É, et al. Infection-related ventilator-associated complications in ICU patients colonised with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Intensive Care Med*. 2018;44:616–26.
 40. Houard M, Rouzé A, Ledoux G, Six S, Jaillette E, Poissy J, et al. Relationship between digestive tract colonization and subsequent ventilator-associated pneumonia related to ESBL-producing Enterobacteriaceae. Kou YR, editor. *PLoS One*. 2018;13:e0201688.
 41. Barbier F, Pommier C, Essaïd W, Garrouste-Orgeas M, Schwebel C, Ruckly S, et al. Colonization and infection with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in ICU patients: what impact on outcomes and carbapenem exposure? *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:1088–97.
 42. Brun-Buisson C, Legrand P, Rauss A, Richard C, Montravers F, Besbes M, et al. Intestinal decontamination for control of nosocomial multiresistant gram-negative bacilli. Study of an outbreak in an intensive care unit. *Ann Intern Med*. 1989;110:873–81.
 43. Troché G, Joly L-M, Guibert M, Zazzo J-F. Detection and treatment of antibiotic-resistant bacterial carriage in a surgical intensive care unit: a 6-year prospective survey. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005;26:161–5.
 44. Camus C, Sauvadet E, Tavenard A, Piau C, Uhel F, Bouju P, et al. Decline of multidrug-resistant Gram negative infections with the routine use of a multiple decontamination regimen in ICU. *J Inf Secur*. 2016;73:200–9.
 45. Decré D, Gachot B, Lucet JC, Arlet G, Bergogne-Bérézin E, Rénier B. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 1998;27:834–44.
 46. Wittekamp BH, Plantinga NL, Cooper BS, Lopez-Contreras J, Coll P, Mancebo J, et al. Decontamination strategies and bloodstream infections with antibiotic-resistant microorganisms in ventilated patients: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2018;320:2087.
 47. Tacconelli E. EUCIC medical guidelines on decolonization of multidrug-resistant gram-negative organisms; 2018.
 48. Tissera K, Liyanapathirana V, Dissanayake N, Pinto V, Ekanayake A, Tennakoon M, et al. Spread of resistant gram negatives in a Sri Lankan intensive care unit. *BMC Infect Dis*. 2017;17:490.
 49. Conterno LO, Shymanski J, Ramotar K, Toye B, Zvonar R, Roth V. Impact and cost of infection control measures to reduce nosocomial transmission of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms in a non-outbreak setting. *J Hosp Infect*. 2007;65:354–60.
 50. Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Stranden A, Widmer AF. Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae without contact isolation. *Clin Infect Dis*. 2012;55:1505–11.
 51. Souverein D, Euser SM, Herpers BL, Hattink C, Houtman P, Popma A, et al. No nosocomial transmission under standard hygiene precautions in short term contact patients in case of an unexpected ESBL or Q&A *E. coli* positive patient: a one-year prospective cohort study within three regional hospitals. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6 Available from: <http://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-017-0228-6>. [cited 2018 Oct 31].
 52. Zahar JR, Poirel L, Dupont C, Fortineau N, Nassif X, Nordmann P. About the usefulness of contact precautions for carriers of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis*. 2015;15 Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1244-x>. [cited 2018 Oct 31].
 53. Zahar JR, Garrouste-Orgeas M, Vesin A, Schwebel C, Bonadona A, Philippart F, et al. Impact of contact isolation for multidrug-resistant organisms on the occurrence of medical errors and adverse events. *Intensive Care Med*. 2013; 39:2153–60.
 54. Morgan DJ, Diekema DJ, Sepkowitz K, Perencevich EN. Adverse outcomes associated with contact precautions: a review of the literature. *Am J Infect Control*. 2009;37:85–93.
 55. Gurieva T, Dautzenberg MJD, Gniadkowski M, Derde LPG, Bonten MJM, Bootsma MCJ. The transmissibility of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in intensive care units. *Clin Infect Dis*. 2018;66:489–93.
 56. Scheuerman O, Schechner V, Carmeli Y, Gutiérrez-Gutiérrez B, Calbo E, Almirante B, et al. Comparison of predictors and mortality between bloodstream infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39:660–7.
 57. Freeman JT, Rubin J, McAuliffe GN, Peirano G, Roberts SA, Drinković D, et al. Differences in risk-factor profiles between patients with ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicentre case-case comparison study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2014;3:27.
 58. Han JH, Bilker WB, Nachamkin I, Zautis TE, Coffin SE, Linkin DR, et al. The effect of a hospital-wide urine culture screening intervention on the incidence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:1160–6.
 59. Djibré M, Fedun S, Le Guen P, Vimont S, Hafiani M, Fulgencio J-P, et al. Universal versus targeted additional contact precautions for multidrug-resistant organism carriage for patients admitted to an intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2017;45:728–34.
 60. Dananché C, Bénet T, Allaouchiche B, Hernu R, Argaud L, Dauwalder O, et al. Targeted screening for third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae carriage among patients admitted to intensive care units: a quasi-experimental study. *Crit Care*. 2015;19:38.
 61. Tschudin-Sutter S, Lucet J-C, Mutters NT, Tacconelli E, Zahar JR, Harbarth S. Contact precautions for preventing nosocomial transmission of extended-spectrum β lactamase-producing *Escherichia coli*: a point/counterpoint review. *Clin Infect Dis*. 2017;65:342–7.
 62. Vodovar D, Marcadé G, Rousseau H, Raskine L, Vicaut E, Deye N, et al. Predictive factors for extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae causing infection among intensive care unit patients with prior colonization. *Infection*. 2014;42:743–8.
 63. Goulenok T, Ferroni A, Bille E, Lécuyer H, Join-Lambert O, Descamps P, et al. Risk factors for developing ESBL *E. coli*: can clinicians predict infection in patients with prior colonization? *J Hosp Infect*. 2013;84:294–9.

64. Gorrie CL, Mirčeta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin Infect Dis*. 2017;65:208–15.
65. Sakellariou C, Güntke S, Steinmetz I, Kohler C, Pfeifer Y, Gastmeier P, et al. Sepsis caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-Positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: comparison of severity of sepsis, delay of anti-infective therapy and ESBL genotype. Yam WC, editor. *PLoS One*. 2016;11:e0158039.
66. Falcone M, Vena A, Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Goldoni P, et al. Role of empirical and targeted therapy in hospitalized patients with bloodstream infections caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae. *Ann Ig Med Prev E Comunita*. 2014;26:293–304.
67. Joo E-J, Park DA, Lee NR, Moon S-Y, Choi J-K, Ko J-H, et al. Impact of appropriateness of empiric therapy on outcomes in community-onset bacteremia by extended-spectrum- β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* definitively treated with carbapenems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:2093–100.
68. Vogelaers D, De Bels D, Forêt F, Cran S, Gilbert E, Schoonheydt K, et al. Patterns of antimicrobial therapy in severe nosocomial infections: empiric choices, proportion of appropriate therapy, and adaptation rates—a multicentre, observational survey in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:375–81.
69. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, Mo Y, Lee TH, Yilmaz M, et al. Effect of piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2018;320:984.
70. Prevel R, Berdai D, Boyer A. Antibiotics for ceftriaxone-resistant Gram-negative bacterial bloodstream infections. *JAMA*. 2019;321:613.
71. Boucher A, Meybeck A, Patoz P, Valette M, Thellier D, Delannoy PY, et al. Alternatives to carbapenems in ventilator-associated pneumonia due to ESBL-producing Enterobacteriaceae. *J Inf Secur*. 2016;73:293–6.
72. Torres A, Zhong N, Pacht J, Timsit J-F, Kollef M, Chen Z, et al. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:285–95.
73. Wagenlehner FM, Umeh O, Steenbergen J, Yuan G, Darouiche RO. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: a randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI). *Lancet*. 2015;385:1949–56.
74. Timsit J-F, Pilimis B, Zahar J-R. How should we treat hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae? *Semin Respir Crit Care Med*. 2017;38:287–300.
75. Dautzenberg MJD, Bayjanov JR, Leverstein-van Hall MA, Muller AE, Gelinck LBS, Jansen CL, et al. Dynamics of colistin and tobramycin resistance among *Enterobacter cloacae* during prolonged use of selective decontamination of the digestive tract. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:67.
76. Halaby T, Al Naiemi N, Kluytmans J, van der Palen J, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Emergence of colistin resistance in Enterobacteriaceae after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:3224–9.
77. Al Naiemi N, Heddema ER, Bart A, de Jonge E, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PHM, et al. Emergence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria during selective decontamination of the digestive tract on an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:853–6.
78. Huttner B, Hausteiner T, Uckay I, Renzi G, Stewardson A, Schaeffer D, et al. Decolonization of intestinal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae with oral colistin and neomycin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother*. 2013; Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt174>. [cited 2018 Oct 31].
79. Gosalbes MJ, Vázquez-Castellanos JF, Angebault C, Woerther P-L, Ruppé E, Ferrús ML, et al. Carriage of Enterobacteria producing extended-spectrum β -lactamases and composition of the gut microbiota in an Amerindian community. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:507–14.
80. Araos R, Tai AK, Snyder GM, Blaser MJ, D'Agata EMC. Predominance of *Lactobacillus* spp. among patients who do not acquire multidrug-resistant organisms. *Clin Infect Dis*. 2016;63:937–43.
81. Bilinski J, Grzesiowski P, Sorensen N, Madry K, Muszynski J, Robak K, et al. Fecal microbiota transplantation in patients with blood disorders inhibits gut colonization with antibiotic-resistant bacteria: results of a prospective, single-center study. *Clin Infect Dis*. 2017;65:364–70.
82. Singh R, van Nood E, Nieuwdorp M, van Dam B, ten Berge IJM, Geerlings SE, et al. Donor feces infusion for eradication of extended Spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in a patient with end stage renal disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:O977–8.
83. Singh R, de Groot PF, Geerlings SE, Hodiament CJ, Belzer C, Berge IJMT, et al. Fecal microbiota transplantation against intestinal colonization by extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: a proof of principle study. *BMC Res Notes*. 2018;11:190.
84. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, et al. A five-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.009>.
85. Ruppé E, Martin-Loeches I, Rouzé A, Levast B, Ferry T, Timsit J-F. What's new in restoring the gut microbiota in ICU patients? Potential role of faecal microbiota transplantation. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:803–5.
86. Caballero S, Kim S, Carter RA, Leiner IM, Sušac B, Miller L, et al. Cooperating commensals restore colonization resistance to vancomycin-resistant enterococcus faecium. *Cell Host Microbe*. 2017;21:592–602 e4.
87. Piewngam P, Quiñones M, Thirakittiwattana W, Yungyuen T, Otto M, Kiratisin P. Composition of the intestinal microbiota in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae carriers and non-carriers in Thailand. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857918303686>. [cited 2018 Dec 20].

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)



Annexe 3. Lettre de réponse publiée dans Journal of American Medical Association

Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, Mo Y, Lee TH, Yilmaz M, *et al.* MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASID-CRN). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 2018 Sep 11;320(10):984-994. doi: 10.1001/jama.2018.12163.

Nous discutons les résultats de cette large étude multicentrique, contrôlée, randomisée ne parvenant pas à montrer la non-infériorité de la pipéracilline-tazobactam dans le traitement documenté des bactériémies causées par *E. coli* ou *K. pneumoniae* résistantes à la ceftriaxone.

- Dickinson JA, Ogilvie G, Van Niekerk D, Popadiuk C. Evidence that supports policies to delay cervical screening until after age 25 years. *CMAJ*. 2017;189(10):E380-E381. doi:10.1503/cmaj.160636
- Australian Government Department of Health. National Cervical Screening Program. <http://www.health.gov.au/internet/screening/publishing.nsf/Content/cervical-screening-1>. Accessed November 1, 2018.
- Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data. *BMJ*. 2009;339:b2968. doi:10.1136/bmj.b2968
- Landy R, Birke H, Castanon A, Sasieni P. Benefits and harms of cervical screening from age 20 years compared with screening from age 25 years. *Br J Cancer*. 2014;110(7):1841-1846. doi:10.1038/bjc.2014.65

In Reply Dr Dickinson raises the question as to why the USPSTF recommended screening for cervical cancer with cervical cytology every 3 years in women aged 21 to 29 years (A recommendation)¹ rather than starting at age 25 years. In support of starting screening at a later age, he cites the low incidence of cervical cancer in younger women, a case-control study showing no benefit in screening women aged 22 to 24 years vs 25 to 29 years, and clinical data from Wales reporting follow-up testing rates after screening in younger women.

There is no direct evidence on the optimal age at which to start cervical cancer screening. No studies to date have compared various starting ages for screening, nor have screening trials used an appropriate study design or had adequate power to compare various starting ages for screening. Therefore, the USPSTF kept the same starting age for screening as in its 2012 recommendation.² In 2012, the USPSTF did effectively raise the age for cervical cancer screening.² Prior recommendations recommended starting screening at age 21 years or 3 years after sexual activity began, whichever came first. For the 2012 recommendation, the USPSTF reviewed the evidence on screening in women younger than 21 years and found that cervical cancer was extremely rare in this age group, no evidence that sexual history should affect the starting age for screening, and no evidence on harms of screening women younger than 21 years.

There is consensus among US guideline bodies in recommending screening for cervical cancer starting at age 21 years.³ Because some women may have been sexually active for more than 5 years by age 21 years, direct evidence is needed to evaluate the benefits and harms of starting screening at ages older than 21 years. This evidence would be particularly relevant in the new era of HPV vaccination as a means of primary prevention for cervical cancer.

Susan J. Curry, PhD
Alex H. Krist, MD, MPH
Douglas K. Owens, MD, MS

Author Affiliations: University of Iowa, Iowa City (Curry); Fairfax Family Practice Residency, Fairfax, Virginia (Krist); Veterans Affairs Palo Alto Health Care System, Palo Alto, California (Owens).

Corresponding Author: Susan J. Curry, PhD, University of Iowa, 111 Jessup Hall, Iowa City, IA 52242 (chair@uspstf.net).

Conflict of Interest Disclosures: All authors were members of the USPSTF and as such received travel reimbursement and an honorarium for participating in USPSTF meetings. No other disclosures were reported.

- US Preventive Services Task Force. Screening for cervical cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA*. 2018;320(7):674-686. doi:10.1001/jama.2018.10897
- Moyer VA; US Preventive Services Task Force. Screening for cervical cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement [published correction appears in *Ann Intern Med*. 2013;158(11):852]. *Ann Intern Med*. 2012;156(12):880-891. doi:10.7326/0003-4819-156-12-201206190-00424
- Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al; ACS-ASCCP-ASCP Cervical Cancer Guideline Committee. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(3):147-172. doi:10.3322/caac.21139

Antibiotics for Ceftriaxone-Resistant Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections

To the Editor The MERINO trial¹ found that piperacillin-tazobactam did not result in noninferior 30-day mortality in patients with *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections and ceftriaxone resistance, compared with meropenem. We think there might be reasons to explain the results other than differences in effectiveness of the antibiotic regimens.

First, the primary outcome was 30-day all-cause mortality. However, all deaths were unrelated to the infection (eTable 6 in the Supplement of the article) and instead resulted from the underlying diseases (metastatic cancer or end-stage liver disease), and half occurred after 15 days (eFigure 4 in the Supplement).¹ The lack of infectious mortality could explain the lack of association between piperacillin-tazobactam minimum inhibitory concentrations and mortality. Secondary outcomes more directly related to infection showed no significant differences.

Second, important variables were unbalanced in the study groups. A urinary tract source was more frequent in the meropenem group (54.8% vs 67.0%) and a quick sequential organ failure assessment score of 2 or greater was more frequent in the piperacillin-tazobactam group (45.7% vs 40.3%). Information about rapidly fatal conditions at baseline, such as advanced or metastatic cancer (the main cause of deaths and not included in APACHE-II or Pitt scores), was not provided.

Third, only 80% of the isolates were available for centralized confirmatory analysis; of these, 6 of 132 (4.5%) in the piperacillin-tazobactam group and 1 of 174 (0.5%) in the meropenem group had nonsusceptible isolates to the assigned drug. Susceptibility testing was performed using gradient tests, which are unreliable for piperacillin-tazobactam because minimum inhibitory concentrations above the break point are often underestimated. A warning against using piperacillin-tazobactam strips was posted on the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing website in 2015.² Therefore, nonsusceptibility to piperacillin-tazobactam might be higher than stated, as 10% and 67% of isolates had *ampC* and *bla_{OXA-1}* genes, respectively.

Fourth, mortality in the piperacillin-tazobactam group was much higher in the 3 sites from Turkey and South Africa. Excluding these sites would reduce the mortality in the piperacillin-tazobactam group from 12.3% to 9.4%.

Fifth, the patients treated with piperacillin-tazobactam in the propensity score-matched analysis of the INCREMENT

cohort were similar to those in the MERINO trial (eTable 9 in that article³), but the mortality rate was only 7.3% vs 12.3% in MERINO.

We think that because of these issues, replication is needed before piperacillin-tazobactam is abandoned as an alternative to meropenem for the treatment of bloodstream infections caused by cephalosporin-resistant enterobacteria.

Jesús Rodríguez-Baño, MD, PhD

Belén Gutiérrez-Gutiérrez, MD, PhD

Gunnar Kahlmeter, MD, PhD

Author Affiliations: Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain (Rodríguez-Baño, Gutiérrez-Gutiérrez); Clinical Microbiology, Central Hospital, Växjö, Sweden (Kahlmeter).

Corresponding Author: Jesús Rodríguez-Baño, MD, PhD, Hospital Universitario Virgen Macarena, Avda Dr Fedriani 3, Seville 41009, Spain (jesusrb@us.es).

Conflict of Interest Disclosures: Dr Rodríguez-Baño reported receiving honoraria for accredited educational courses from Merck and for coordination of an unrelated research project from AstraZeneca. No other disclosures were reported.

1. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, et al; MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASID-CRN). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2018;320(10):984-994. doi:10.1001/jama.2018.12163

2. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/. Accessed November 2, 2018.

3. Gutiérrez-Gutiérrez B, Pérez-Galera S, Salamanca E, et al. A multinational, preregistered cohort study of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for treatment of bloodstream infections due to extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4159-4169. doi:10.1128/AAC.00365-16

To the Editor Dr Harris and colleagues conducted a well-designed study investigating whether carbapenems for extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteria could be spared.¹ The results should be interpreted with caution.

First, the study failed to demonstrate the noninferiority of piperacillin-tazobactam compared with meropenem but did not demonstrate the superiority of meropenem. The study was stopped at a difference level for the primary outcome of $P < .004$, although the predefined stopping rule for superiority was a statistically significant difference at a level of $P < .001$. A superiority study with a bilateral statistical test instead of a noninferiority study with a unilateral statistical test would have been an option but would have increased the number of patients needed.

Second, a piperacillin-tazobactam infusion over 30 minutes is too short to obtain adequate concentrations according to pharmacokinetics, and it could have impaired the efficiency of piperacillin-tazobactam.²

Third, resistance to penicillins and third-generation cephalosporins mediated by AmpC β -lactamase (implicated in 12.2% of cases) is only minimally inhibited by tazobactam. The distribution of AmpC β -lactamase between the 2 groups was not reported but could have influenced the outcome. In fact, treatment was decided after susceptibility to antibiotics was ob-

tained, so patients infected by AmpC-producing bacteria should have been excluded.

Fourth, it is surprising that patients who received appropriate empirical antibiotic therapy had a higher mortality rate than patients who did not (14.3% vs 8.2% in the piperacillin-tazobactam group and 3.9% vs 3.1% in the meropenem group). Several explanations could be suggested, most of them concerning the patients' care prior to randomization. Patients in the piperacillin-tazobactam group had more infections that often require surgical care to control the source of infection than in the meropenem group (intra-abdominal, surgical site, and skin and soft tissue infections: 24.5% vs 17.3%, respectively). Adequate source control was not described, although it can affect mortality.³ In addition, the empirical antibiotic therapy used was not specified for 67% in the piperacillin-tazobactam group and 60% in the meropenem group, and combination therapy was initiated for 42% and 40%, respectively (eTable 3 in the Supplement of the article¹); combination with aminoglycosides could have been a good option for those patients.

For these reasons, we think that the conclusions should be more cautious. Further studies are needed to optimize the antimicrobial strategies for extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae infections.

Renaud Prevel, MD, MSc

Driss Berdaï, MD, MSc

Alexandre Boyer, MD, PhD

Author Affiliations: Médecine Intensive Réanimation, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France (Prevel, Boyer); Service de Pharmacologie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France (Berdaï).

Corresponding Author: Renaud Prevel, MD, MSc, Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpital Pellegrin 1er étage, Place Amélie Raba-Léon, Bordeaux 33076, France (renaud.prevel@hotmail.fr).

Conflict of Interest Disclosures: Dr Boyer reported receiving a grant from Merck Sharp and Dohme and nonfinancial support from Gilead, Pfizer, and Basilea. No other disclosures were reported.

1. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, et al; MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASID-CRN). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2018;320(10):984-994. doi:10.1001/jama.2018.12163

2. Roberts JA, Ulldemolins M, Roberts MS, et al. Therapeutic drug monitoring of beta-lactams in critically ill patients: proof of concept. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(4):332-339. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.008

3. Viale P, Giannella M, Lewis R, Trecarichi EM, Petrosillo N, Tumbarello M. Predictors of mortality in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(10):1053-1063. doi:10.1586/14787210.2013.836057

In Reply Dr Rodríguez-Baño and colleagues comment that our findings, in which 30-day all-cause mortality was 12.3% (23/187) of patients randomized to piperacillin-tazobactam compared with 3.7% (7/191) randomized to meropenem,¹ stand in contrast to retrospective observational studies in which outcomes were similar between the 2 groups.^{2,3} In any observational study, the choice of antimicrobial is made by the

clinician and is affected by clinical impression of how sick the patient is. Not surprisingly, patients at greater risk of dying may receive an antibiotic that is perceived as more potent, therefore biasing results even if adjustments have been made using severity of illness scores. This bias may explain the observation of Dr Prevel and colleagues that patients in our trial given appropriate initial empirical therapy had a higher risk of dying. We randomized only definitive therapy, not empirical therapy. Some AmpC-producing bacteria are susceptible to piperacillin-tazobactam,⁴ which is why patients with these infections were included in the study.

The major comment of Rodríguez-Baño and colleagues is that our primary end point was all-cause mortality and that most deaths did not appear to be directly due to infection. Attribution of death specifically to infection is notoriously difficult in complicated patients with multiple comorbidities. Seven patients randomized to piperacillin-tazobactam died within a week of randomization compared with 3 patients treated with meropenem. In further analysis, 9 of 23 patients (39.1%) treated with piperacillin-tazobactam who died and 112 of 164 (68.3%) who survived met our definition for clinical or microbiologic success 4 days after assignment to the study drug. We believe that suboptimal early response to treatment of infection pushes vulnerable patients with other significant comorbidities over the edge, leading to premature death from their underlying condition. A body of work supports this concept that many deaths attributable to sepsis occur after the early days of the infection.⁵

Rodríguez-Baño and colleagues are also concerned about imbalance in baseline characteristics and differences by site. We controlled for some variables (ie, urinary tract source), but it is not possible to adjust for every possible confounder in a multivariable analysis with a mortality outcome, as that carries its own risks of misinterpretation. A subgroup analysis of middle- vs high-income countries had a nonsignificant test for interaction.

Rodríguez-Baño and colleagues comment on the lack of correlation between minimum inhibitory concentrations of piperacillin-tazobactam and outcome. Susceptibility testing was performed at each study site according to local practices (typically semiautomated methods). Gradient strips were not typically used by study site laboratories. After the study, isolates were shipped to a central study laboratory where testing by gradient strips and broth microdilution methods is being performed. Further information will soon be available examining correlations among broth microdilution results, β -lactamase type, and outcome.

Prevel and colleagues question why piperacillin-tazobactam was given as a 30-minute infusion. This is the infusion duration recommended in the product information

for the drug. Large randomized clinical trials are ongoing examining extended infusion of piperacillin-tazobactam (NCT03213990).

We agree with the recommendations of the letter writers that further trials should be performed in this area, which would allow a better identification of patient subgroups that could safely benefit from carbapenem-sparing therapy.

Patrick N. A. Harris, MBBS, PhD

Paul Tambyah, MD

David L. Paterson, MBBS, PhD

Author Affiliations: University of Queensland Centre for Clinical Research, Brisbane, Australia (Harris, Paterson); National University Hospital, Singapore (Tambyah).

Corresponding Author: David L. Paterson, MBBS, PhD, University of Queensland Centre for Clinical Research, Faculty of Medicine, Bldg 71/918 Royal Brisbane & Women's Hospital Campus, Herston, Queensland 4029, Australia (d.paterson1@uq.edu.au).

Conflict of Interest Disclosures: Dr Harris reported receiving grants from the Australian Society for Antimicrobials, the International Society for Chemotherapy, the National University Hospital Singapore, the Study, Education, and Research Committee of Pathology Queensland, the Royal College of Pathologists of Australasia Foundation, and Inviragen and receiving support to speak at an education event sponsored by Pfizer. Dr Tambyah reported receiving grants from the National University Health System, GlaxoSmithKline, Janssen, Shionogi, Sanofi-Pasteur, Visterra, Baxter, ADAMAS, Merlion Pharmaceuticals, Fabentech, and Inviragen and honoraria from Novartis and AstraZeneca, all to his institution. Dr Paterson reported receiving grants and personal fees from Shionogi and Merck Sharp and Dohme and personal fees from Pfizer, Achaogen, AstraZeneca, Leo Pharmaceuticals, Bayer, GlaxoSmithKline, Cubist, Venatorx, and Accelerate.

- Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, et al; MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASID-CRN). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2018;320(10):984-994. doi:10.1001/jama.2018.12163
- Gutiérrez-Gutiérrez B, Pérez-Galera S, Salamanca E, et al. A multinational, preregistered cohort study of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for treatment of bloodstream infections due to extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4159-4169. doi:10.1128/AAC.00365-16
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Retamar P, Picón E, Pascual Á; Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Red Española de Investigación en Patología Infecciosa/Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria Group. β -Lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis*. 2012;54(2):167-174. doi:10.1093/cid/cir790
- Cheng L, Nelson BC, Mehta M, et al. Piperacillin-tazobactam versus other antibacterial agents for treatment of bloodstream infections due to AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6):e00276-17. doi:10.1128/AAC.00276-17
- Davis JS, He V, Anstey NM, Condon JR. Long term outcomes following hospital admission for sepsis using relative survival analysis: a prospective cohort study of 1,092 patients with 5 year follow up. *PLoS One*. 2014;9(12):e112224. doi:10.1371/journal.pone.0112224

Annexe 4. Protocole ProbaTazo

Ce protocole est lauréat de l'Appel d'Offre Interne 2019 du CHU de Bordeaux et est actuellement soumis à un Comité de Protection des Personnes. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'une stratégie utilisant la piperacilline-tazobactam en traitement probabiliste des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique survenant chez les patients colonisés à E-BLSE.

**Traitement de la pneumopathie acquise sous ventilation mécanique du patient colonisé
à BLSE en réanimation : évaluation d'une stratégie utilisant la pipéracilline-
tazobactam pour le traitement probabiliste.**

PROBATAZO

Code promoteur : CHUBX 2019/00

**PROTOCOLE DE RECHERCHE
INTERVENTIONNELLE IMPLIQUANT LA PERSONNE HUMAINE A RISQUES
ET CONTRAINTES MINIMES
(recherche de catégorie 2)**

Version finale

Numéro ID-RCB :

Cette recherche interventionnelle a obtenu le financement de l'Appel d'Offre Interne CHU de Bordeaux de 2019

Promoteur :

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12, rue Dubernat
33 400 Talence
FRANCE

Investigateur coordonnateur :

Dr Maxime Poteau
Service de Médecine Intensive Réanimation, 1^{er} étage Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux
Téléphone : 05 56 79 55 17
Télécopie : 05 56 79 61 22
Courriel : maxime.poteau@chu-bordeaux.fr

Centre de Méthodologie et de Gestion des données :

Dr Laura Richert,
Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche Clinique et Epidémiologique du CHU de Bordeaux (USMR)
CHU de Bordeaux
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex – France
Tél. +33 (0)5.57.57.56.64 ▪ Fax +33 (0)5.57.57.15.78
Courriel : laura.richert@u-bordeaux.fr

Ce protocole a été conçu et rédigé à partir de la version 3.0 du 01/02/2017 du protocole-type du GIRCI SOHO

HISTORIQUE DES MISES A JOUR DU PROTOCOLE

VERSION	DATE	RAISON DE LA MISE A JOUR
finale		Soumission à l'AAP AOI 2019

PAGE DE SIGNATURE DU PROTOCOLE

Traitement probabiliste de la pneumopathie acquise sous ventilation mécanique du patient colonisé à BLSE en réanimation : évaluation d'une stratégie utilisant la pipéracilline-tazobactam pour le traitement probabiliste.

PROBATAZO

Code promoteur : CHUBX 2019/00

Promoteur

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12, rue Dubernat
33400 Talence

à Bordeaux, le : *date*

Le Directeur Général du CHU de Bordeaux
P. VIGOUROUX
Et par délégation, le Directeur de la Recherche
Clinique et de l'Innovation,
J. BELCASTRO

Investigateur coordonnateur

Dr Maxime Poteau
Service de Médecine Intensive Réanimation, 1er étage Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux
Téléphone : 05 56 79 55 17
Courriel : maxime.poteau@chu-bordeaux.fr

à Bordeaux, le : *date*

Télécopie : 05 56 79 61 22

Dr Maxime POTEAU

PRINCIPAUX CORRESPONDANTS

Investigateur coordonnateur

Dr Maxime POTEAU
Service de Médecine Intensive Réanimation, 1^{er}
étage Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux
Téléphone : 05 56 79 55 17
Télécopie : 05 56 79 61 22
Courriel : maxime.poteau@chu-bordeaux.fr

Investigateurs

Pr Didier GRUSON
Service de Médecine Intensive Réanimation, 1^{er}
étage Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux
Téléphone : 05 56 79 55 17
Télécopie : 05 56 79 61 22
Courriel : didier.gruson@chu-bordeaux.fr

Dr Chloé GISBERT-MORA
Centre hospitalier de la Côte Basque
13, avenue de l'interne Jacques Loeb
64 100 Bayonne
Téléphone : 05 59 44 36 12
Courriel : cgisbert-mora@ch-cotebasque.fr

Dr Cédric CARRIE
Réanimation chirurgicale, Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux
Téléphone : 05 56 77 44 28
Courriel : cedric.carrie@chu-bordeaux.fr

Dr Noémie SAUVAGE
Réanimation chirurgicale, Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux
Téléphone : 05 56 77 44 28
Courriel : noemie.sauvage@chu-bordeaux.fr

Promoteur

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12 rue Dubernat
33 400 Talence
FRANCE

-Responsable de la recherche au niveau du promoteur
Jonathan BELCASTRO - Directeur de la Recherche
Clinique et de l'Innovation
Dr Anne GIMBERT - Responsable « Promotion interne »
Tél : 05 57 82 08 34 – Fax : 05 56 79 49 26
Courriel : anne.gimbert@chu-bordeaux.fr

-Responsable d'Etudes Cliniques

Mme Céline BAIRRAS-MARTIN
Tél. : 05 57 82 03 29 - Fax : 05 56 79 49 26
Courriel : celine.bairras-martin@chu-bordeaux.fr

Attaché(e) de Recherche Clinique coordonnateur

Nom de l'Attaché(e) de Recherche Clinique
Adresse
Tél. : 0000000000 - Fax : 0000000000
Courriel : courriel

Centre de Méthodologie et de Gestion des données
Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche Clinique
et Epidémiologique du CHU de Bordeaux (USMR)
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex – France

Méthodologiste :

Dr Laura RICHERT
Tél. +33 (0)5.57.57.56.64 ▪ Fax +33 (0)5.57.57.15.78
E-mail : laura.richert@u-bordeaux.fr

Statisticienne :

Tanguy Cariou
Tél. +33 (0)5.57.57.57.26 ▪ Fax +33 (0)5.57.57.15.78
E-mail : tanguy.cariou@u-bordeaux.fr

Coordonnateur scientifique

Renaud PREVEL
Service de Médecine Intensive Réanimation, 1^{er} étage
Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux
Téléphone : 05 56 79 55 17
Télécopie : 05 56 79 61 22
Courriel : renaud.prevel@chu-bordeaux.fr

SOMMAIRE

1. RESUME DE LA RECHERCHE	8
ABSTRACT	12
2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE	14
2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	14
2.1.1. <i>Sur la pathologie</i>	14
2.1.2. <i>les stratégies à l'étude</i>	15
2.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE ET RESULTATS ATTENDUS	15
2.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES	16
2.4. RAPPORT BENEFICE/RISQUE	17
2.5. RETOMBÉES ATTENDUES	18
2.6. JUSTIFICATION DU FAIBLE NIVEAU D'INTERVENTION	18
3. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	18
3.1. OBJECTIF PRINCIPAL	18
3.2. OBJECTIFS SECONDAIRES	19
4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE	19
5. CRITERES D'ÉLIGIBILITE	19
5.1. CRITERES D'INCLUSION	19
5.2. CRITERES DE NON INCLUSION	20
5.3. FAISABILITE ET MODALITES DE RECRUTEMENT	20
6. STRATEGIE(S) DE LA RECHERCHE	21
6.1. STRATEGIE ETUDIEE	21
6.2. CIRCUIT DES PRODUITS	22
7. CRITERES DE JUGEMENT	22
7.1. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL	22
7.2. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES	22
8. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE	23
8.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE	23
8.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PARTICIPANT	24
8.3. INCLUSION ET RECUEIL DES DONNEES	24
8.3.1. <i>Recueil du consentement</i>	24
8.3.2. <i>Déroulement du recueil des donnees</i>	25
8.4. ABANDON ET RETRAIT DE CONSENTEMENT	25
8.5. REGLES D'ARRET DE LA RECHERCHE	25
8.6. DEVIATIONS AU PROTOCOLE	25
8.6.1. <i>Arrêt prématuré et définitif de la stratégie de la recherche</i>	25
8.6.2. <i>Participant perdu de vue</i>	25
8.6.3. <i>Participant inclus à tort</i>	26
8.7. RISQUES ET CONTRAINTES MINIMES LIEES A LA RECHERCHE ET INDEMNISATION EVENTUELLE DES PARTICIPANTS	26
9. GESTION DES ÉVÉNEMENTS INDÉSIRABLES / EFFETS INDESIRABLES /INCIDENTS	26
10. ASPECTS STATISTIQUES	26
10.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE	26
10.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES	26
10.2.1. <i>Stratégie d'analyse</i>	26
10.2.2. <i>Méthodes statistiques descriptives</i>	26
10.2.3. <i>Methodes statistiques comparatives</i>	27
10.2.4. <i>Logiciel utilisé</i>	27
10.3. PLAN D'ANALYSE	27
10.3.1. <i>Description des inclusions et du suivi</i>	27
10.3.2. <i>Patients exclus de l'analyse</i>	27

10.3.3.	<i>Caractéristiques des patients à l'inclusion</i>	27
10.3.4.	<i>Analyse de l'objectif principal</i>	27
10.3.5.	<i>Analyse des objectifs secondaires</i>	27
10.4.	SURVEILLANCE DE LA RECHERCHE	28
10.4.1.	<i>Conseil Scientifique</i>	28
10.4.2.	<i>Comité Indépendant de Surveillance</i>	28
11.	DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE	28
11.1.	ACCES AUX DONNEES	28
11.2.	DONNEES SOURCE	29
11.3.	CONFIDENTIALITE DES DONNEES	29
12.	CONTROLE ET ASSURANCE QUALITE	29
12.1.	CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES	29
12.2.	CONTROLE QUALITE	29
12.3.	GESTION DES DONNEES	29
12.3.1.	<i>Logiciel de gestion de données</i>	29
12.3.2.	<i>Création du cahier d'observation</i>	30
12.3.3.	<i>Saisie des données</i>	30
12.3.4.	<i>Droit d'accès</i>	30
12.3.5.	<i>Rôles</i>	30
12.3.6.	<i>Codage des données</i>	30
12.3.7.	<i>Contrôles des données</i>	30
12.3.8.	<i>Réconciliation des bases EI/EIG</i>	30
12.3.9.	<i>Gel de la base de données</i>	30
12.3.10.	<i>Transfert des données</i>	30
12.3.11.	<i>Archivage de la base de données</i>	31
12.3.12.	<i>Management de la qualité</i>	31
12.4.	AUDIT ET INSPECTION	31
13.	CONSIDERATIONS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES	31
14.	CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE	32
15.	RAPPORT FINAL	32
16.	REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION	32
16.1.	COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	32
16.2.	COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PARTICIPANTS	33
16.3.	CESSION DES DONNEES	33
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34
	ANNEXES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

LISTE DES ABREVIATIONS

- AMM : autorisation de mise sur le marché
- CMG : Centre de Méthodologie et de Gestion des données
- CMI : concentration minimale inhibitrice
- E-BLSE : Entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi
- EPC : Entérobactéries productrices de carbapénémases
- FiO₂ : fraction inspirée en oxygène
- GPR : Groupes de Prescription et Rein
- IVSE : intra-veineux à la seringue électrique
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PaO₂ : pression artérielle en oxygène
- PAVM : pneumopathie acquise sous ventilation mécanique
- PCT : procalcitonine
- PEP: pression expiratoire positive
- PHRC: Programme Hospitalier de Recherche Clinique
- SOFA : Score of Organe Failure Assessment
- VPN : valeur prédictive négative
- VPP : valeur prédictive positive

1. RESUME DE LA RECHERCHE

PROMOTEUR	CHU de Bordeaux
INVESTIGATEUR COORDONNATEUR	Dr Maxime Poteau Service de Médecine Intensive Réanimation, 1er étage Hôpital Pellegrin Place Amélie Raba Léon 33000 Bordeaux Téléphone : 05 56 79 55 17 - Télécopie : 05 56 79 61 22 Courriel : maxime.poteau@chu-bordeaux.fr
ACRONYME ET TITRE	PROBATAZO Traitement probabiliste de la pneumopathie acquise sous ventilation mécanique du patient colonisé à BLSE en réanimation : évaluation d'une stratégie utilisant la pipéracilline-tazobactam pour le traitement probabiliste.
TITRE SIMPLIFIE	Evaluation de la stratégie utilisant initialement la pipéracilline-tazobactam en traitement empirique de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique chez le patient colonisé à E-BLSE.
JUSTIFICATION / CONTEXTE	<p>L'augmentation de l'antibiorésistance est une menace globale. En Europe, elles ont causé 33 000 décès en 2015 avec une crainte particulière concernant les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi (E-BLSE). Les mesures d'hygiène sont parvenues à freiner mais pas à abolir toute transmission. L'Organisation Mondiale de la Santé a tiré un signal d'alarme majeur sur le risque d'infections à bactéries résistantes à tous les antibiotiques connus à l'horizon 2050. Dans ce contexte, le traitement de ces E-BLSE par des carbapénèmes a entraîné l'apparition d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes pouvant dès aujourd'hui aboutir à des impasses thérapeutiques. Il apparait dès lors primordial d'épargner au maximum l'utilisation des carbapénèmes d'autant plus que les E-BLSE peuvent garder une sensibilité à certaines bêta-lactamines (céfépime, pipéracilline-tazobactam), certains aminosides voire au triméthoprim-sulfaméthoxazole.</p> <p>Le débat sur un lien existant entre colonisation rectale et risque de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) est d'actualité encore plus lorsqu'il s'agit de bactéries résistantes comme les E-BLSE. Il semble que le dépistage du portage rectal d'E-BLSE a une bonne valeur prédictive négative permettant d'épargner les carbapénèmes pour le traitement de PAVM chez les patients à dépistage négatif.</p> <p>En revanche, la conduite à tenir en cas de survenue de PAVM chez les patients porteurs rectaux de ces E-BLSE n'est pas codifiée. En pratique courante, certaines équipes en font pas de dépistage et utilisent systématiquement de la pipéracilline-tazobactam, d'autres préfèrent utiliser des carbapénèmes largement en cas de portage, enfin d'autres équipes utilisent de la pipéracilline-tazobactam chez les porteurs. A l'ère d'une médecine fondée sur les preuves, des données scientifiques de bonne qualité sont indispensables pour évaluer l'une et l'autre de ces stratégies. Les travaux préliminaires de notre équipe (soumis à une revue de grade B), en accord avec d'autres études dans la littérature, ont montré que les infections survenant chez ces patients colonisés à E-BLSE n'étaient dues à cette E-BLSE que dans 10 à 20% des cas. De plus, ces E-BLSE sont sensibles à 90% à la pipéracilline-tazobactam (données de surveillance locale et données européennes). Seulement 1 à 2% des PAVM chez ces patients colonisés seraient donc réellement dues à des E-BLSE résistantes à la pipéracilline. De plus, l'adaptation du traitement probabiliste ne ressort pas comme facteur de risque de mortalité indépendant dans les études rétrospectives existant sur les bactériémies à E-BLSE, ces facteurs de risque étant essentiellement liés à l'hôte.</p>

	<p>Ces résultats posent la question de la pertinence d'une stratégie d'utilisation systématique des carbapénèmes pour le traitement probabiliste des PAVM chez ces patients porteurs mais non nécessairement infectés à E-BLSE et pourrait favoriser une stratégie d'emploi systématique de la pipéracilline-tazobactam. A ce stade, aucune étude ne permet de trancher clairement sur la possibilité d'épargne des carbapénèmes dans cette situation.</p>
<p>OBJECTIFS</p>	<p><u>L'objectif principal</u> est :</p> <ul style="list-style-type: none"> - d'estimer la mortalité en réanimation des patients ayant une colonisation digestive à E-BLSE, bénéficiant d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. <p>Les <u>objectifs secondaires</u> sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Explorer l'efficacité clinique d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE - Explorer l'efficacité biologique d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE - Explorer la couverture microbiologique d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE - Etudier la survenue d'effets indésirables lors d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE
<p>SCHEMA DE LA RECHERCHE</p>	<p>Essai clinique de phase II mono-bras bicentrique</p>
<p>CRITERES D'INCLUSION</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Patient majeur hospitalisé en service de Réanimation - Porteur sur l'écouvillon rectal (d'admission ou de suivi) d'une E-BLSE - Suspect de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique selon les critères validés dans les recommandations. - Consentement (selon procédure d'urgence).
<p>CRITERES DE NON INCLUSION</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Choc septique selon les critères Sepsis-3. - Neutropénie < 500/mm³. - Colonisation connue dans les 6 mois précédent par une Entérobactérie productrice de carbapénémase ou <i>A. baumannii</i> multirésistant. - Infection dans les 6 mois précédent causée par une bactérie résistante à la pipéracilline-tazobactam. - Episode de PAVM survenant chez un patient ayant reçu de la pipéracilline-tazobactam dans les 10 derniers jours. - Allergie prouvée à la pénicilline ou au tazobactam. - Femme enceinte ou allaitante. - Patient sous mesures de protection (curatelle, tutelle, sauvegarde de justice). - Personnes incarcérées - Limitation ou arrêt des thérapeutiques actives. - Personne non affiliée ou non bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale.

<p>STRATEGIE DE LA RECHERCHE</p>	<p>Stratégie de traitement global :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Traitement probabiliste en monothérapie : Pipéracilline-tazobactam en dose de charge 4g puis 16g par jour en IVSE le 1^{er} jour (J0) puis adaptation à la fonction rénale selon les recommandations des « Groupes de Prescription et Rein » (GPR) sauf en cas d’hyperclairance rénale, auquel cas la posologie sera adaptée selon les données actuelles de la littérature. - Traitement documenté : le choix du traitement antibiotique sera ensuite adapté dès obtention de l’antibiogramme avec utilisation de l’antibiotique indiqué dans les PAVM ayant le spectre d’action le plus étroit pour une durée totale de traitement de 7 jours selon les recommandations formalisées d’expert de la SRLF-SFAR de 2017 ou escalade thérapeutique selon les critères définis dans ce protocole.
<p>CRITERES DE JUGEMENT</p>	<p>Critère de jugement <u>principal</u> : proportion de participants décédés lors de leur séjour en réanimation.</p> <p>Critères de jugement <u>secondaires</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proportion de participants décédés entre J0 et J28 - Proportion de participants décédés entre J0 et J90 - Proportion de participants dont la mortalité est attribuable à la PAVM - Durée médiane de ventilation mécanique - Durée médiane de séjour en réanimation - Efficacité clinique à J3 et J7 - Proportion de patients nécessitant une escalade du traitement probabiliste de la pipéracilline-tazobactam au méropénème. - Proportion de patients ayant un nouvel épisode de PAVM entre la fin du traitement de l’étude et 48 heures après leur extubation. - Cinétique de la concentration plasmatique de procalcitonine entre J0 et J3 - Proportion de patients ayant un germe isolé sur les prélèvements avant introduction du traitement de l’étude (pipéracilline-tazobactam) sensible à la pipéracilline-tazobactam selon les critères EUCAST 2019. - Proportion de patients ayant un germe isolé sur les prélèvements avant introduction du traitement de l’étude (pipéracilline-tazobactam) sensible à au méropénème selon les critères EUCAST 2019. - Proportion de patients ayant une PAVM documentée à E-BLSE. - Proportion de patient ayant eu un ou plusieurs événement(s) indésirable(s) lié(s) ou probablement lié(s) au traitement par pipéracilline-tazobactam
<p>TAILLE D’ETUDE</p>	<p>30 patients</p>
<p>DUREE DE LA RECHERCHE</p>	<p>Durée d’inclusion : 24 mois Durée de participation pour chaque patient : 90 jours Durée totale de la recherche : 27 mois</p>
<p>ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES</p>	<p>Compte tenu du caractère exploratoire de l’étude, toutes les analyses seront effectuées sur données disponibles : le nombre de données manquantes sera décrit mais aucune stratégie de remplacement des données manquantes ne sera effectuée.</p> <p>Pour l’analyse du critère de jugement principal, la proportion de patients décédés durant leur séjour en réanimation, ainsi que son intervalle de confiance à 95% selon la loi binomiale exacte, seront calculés.</p>

RETOMBÉES ATTENDUES

Cet essai pilote prépare un essai randomisé à large échelle avec une hypothèse de non-infériorité qui sera nécessaire pour confirmer la non-infériorité de la stratégie incluant la pipéracilline-tazobactam en traitement probabiliste dans cette indication de façon robuste.

Les bénéfices attendus pour le patient sont avant tout une exposition moindre à des antibiotiques à large spectre. Cela diminue le risque de sélection de bactéries résistantes aux carbapénèmes qui sont des antibiotiques de dernière ligne. En cas de nouvelle infection, le risque d'avoir une antibiothérapie non adaptée sera diminué.

Les bénéfices pour la santé publique rejoignent les bénéfices individuels. En diminuant l'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes, il sera possible de diminuer les coûts hospitaliers de dépistage, de précautions d'hygiène et de personnel. Cela permet également de continuer à pouvoir utiliser des antibiotiques de spectre plus étroit sans surcoût. Une antibiothérapie inadaptée étant associée à une durée de séjour prolongée, en diminuant l'émergence de bactéries résistantes, on contribue à éviter l'allongement de la durée d'hospitalisation.

La modification de stratégie antibiotique dans cette indication qui pourrait découler de ces recherches permettrait également de réévaluer la pertinence du dépistage systématique de la colonisation digestive à E-BLSE en réanimation., dépistage ayant un coût humain et financier non négligeable.

ABSTRACT

This research has been registered in <http://www.clinicaltrials.gov/> under the n° *numéro*.

PROBATAZO

Antimicrobial therapy for ventilator-associated pneumonia among patients colonized with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* : efficacy of a strategy using piperacillin-tazobactam as empirical treatment.

Efficacy of piperacillin-tazobactam as empirical antimicrobial therapy for VAP among ESBL-E carriers.

The University Hospital of Bordeaux is the sponsor of this research.

This research will be conducted with the support of “Appel d’Offre Interne 2019 du CHU de Bordeaux”.

- **Brief summary** : Antimicrobial resistance is a major threat worldwide and now concerns last-resource antibiotics such as carbapenems. As the resistance to carbapenems is directly due to their use, their spare has become a public health emergency. Their efficacy in ventilator-associated pneumonia has never been compared to other classes of antibiotics such as piperacillin-tazobactam which can be an alternative to carbapenems.
- **Detailed description**: the rising antimicrobial resistance has led to more than 33,000 deaths in Europe in 2015. Among them, extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) are the most frequent in Europe and carbapenems are recommended as a first line treatment by the guidelines despite the fact they are last-resource agents. Nevertheless, the overuse of carbapenems triggered the emergence of carbapenems-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). Alternatives to carbapenems are needed to treat ESBL-E infections efficiently without selecting CRE. One strategy described during the last few years is to guide the empirical antimicrobial therapy upon the fecal carriage of ESBL-E. In fact, ESBL-E fecal carriers are more often colonised in the lungs with ESBL-E and have more subsequent ESBL-E infections than non-carriers. Whatever, the positive predictive value of ESBL-E fecal carriage for subsequent ESBL-E is only of 40% despite a negative predictive value of almost 100%. Besides, a before-after cohort study with and without ESBL-E fecal carriage screening exhibited a decreased of carbapenems consumption without any clinical harm. Several studies compared carbapenems vs alternatives after ESBL-E documentation and did not find any clinical harm either but carbapenems were almost always used before documentation. At the best of our knowledge, no study prospectively investigated an alternative to carbapenems for the empirical antimicrobial therapy (before documentation) of ventilator-associated pneumonia despite those encouraging data. We are so planning to assess the safety of piperacillin-tazobactam for the empirical antimicrobial therapy in case of ventilator-associated pneumonia among ESBL-E fecal carriers. The treatment will be then adapted after obtention of the susceptibility profile. The follow-up of the patients will last until 28 days after their inclusion and until their discharge from intensive care unit if it occurs later. Bacterial susceptibility to the antimicrobial treatment and clinical outcomes will be recorded.
- **Primary outcome**: ICU mortality
- **Secondary outcomes**:
 - Day-28 mortality
 - Day-90 mortality
 - ICU mortality due to VAP episode
 - Mechanical ventilation length
 - ICU length of stay
 - Clinical cure at day 3 and day 4
 - Proportion of patients with empirical antimicrobial switch from piperacillin-tazobactam to meropenem
 - Proportion of patients with VAP recurrence from the end of the study treatment to 2 days after extubation
 - Plasmatic procalcitonin kinetics between day 0 and day 3
 - Proportion of patients with VAP causal bacterial isolates susceptible to piperacillin-tazobactam according to EUCAST 2019 guidelines
 - Proportion of patients with VAP causal bacterial isolates susceptible to meropenem according to EUCAST 2019 guidelines

- Proportion of patients with subsequent ESBL-E VAP
- Treatment-related side effects
- **Study design:** phase II single-arm clinical trial
 - inclusion criteria:
 - Patient above 18 year-old admitted to intensive care unit
 - ESBL-E fecal carriage according to current screening recommendations
 - Suspicion of ventilator-associated pneumonia according to ICU society guidelines
 - Consent to participate according to emergency procedure
 - Non-inclusion criteria:
 - Septic shock according to Sepsis-3 classification
 - Neutropenia (neutrophils count < 500/mm³)
 - Known fecal carriage of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae or multi-drug resistant *A. baumannii* during the past 6 months.
 - Infection with a bacteria resistant to piperacillin-tazobactam during the past 6 months
 - VAP episode occurring in a patient who had received piperacillin-tazobactam in the 10 previous days
 - Proven hypersensitivity to penicillin or tazobactam
 - Pregnancy or breastfeeding
 - Curatorship or guardianship
 - Prisoners
 - No health insurance
- **Arm number or label and arm type:** the patients included will receive piperacillin-tazobactam as empirical antimicrobial therapy. The empirical microbial therapy will last until the obtention of the bacterial susceptibility profile.
 - **Intervention(s):** at the time of ventilator-associated pneumonia diagnosis, patients will receive an initial 4g loading dose of piperacillin-tazobactam with a continuous maintenance dose of 16g per day the first day of treatment. The dose of the piperacillin-tazobactam administered the following days will be adjusted to the renal function.
 - The antimicrobial treatment will be adjusted to the narrower-spectrum agent after obtention of the antimicrobial susceptibility profile for a total length of treatment of seven days.
- **Number of subjects:** 30 patients
- **Statistical analyses:** Proportion of deceased patients during their ICU stay will be expressed with their 95% confidence interval.
- **Conditions:** ESBL-E ; fecal carriage ; ventilator-associated pneumonia
- **Key-words:** ESBL-E ; fecal carriage ; ventilator-associated pneumonia; intensive care unit, piperacillin-tazobactam

2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE

2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

2.1.1. SUR LA PATHOLOGIE

L'émergence et la dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème de santé publique majeur. Cette antibiorésistance a causé la mort de 33 000 personnes en Europe en 2015 (1) et 10 millions décès par an directement liés à l'antibiorésistance sont attendus dans le monde en 2050 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2). L'OMS a d'ailleurs récemment alerté contre le risque d'une situation « post-antibiotique » avec un retentissement dramatique mondial. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi (E-BLSE) sont les bactéries résistantes aux antibiotiques les plus fréquemment rencontrées en Europe. Les infections à E-BLSE entraînent une mortalité accrue ainsi que des durées et des coûts d'hospitalisation accrus (3). Le traitement de première ligne en cas d'infection suspectée ou prouvée à E-BLSE repose souvent sur l'utilisation de carbapénèmes sans qu'aucune recommandation n'ait pu trancher en l'absence de donnée scientifique de bon niveau de preuve (4).

Le problème posé est que les carbapénèmes sont des antibiotiques de dernière ressource et que leur utilisation a conduit à la sélection d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (5). Cette situation amène d'ores et déjà des situations d'impasse thérapeutique (6,7). Il apparaît dès lors primordial d'épargner au maximum l'utilisation des carbapénèmes d'autant plus que les E-BLSE peuvent garder une sensibilité à certaines bêta-lactamines (céfépime, pipéracilline-tazobactam), à certains aminosides voire au triméthoprim-sulfaméthoxazole.

Les stratégies d'épargne des carbapénèmes peuvent avoir lieu lors du traitement après obtention de la documentation microbiologique. Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) et les bactériémies sont les deux infections nosocomiales les plus fréquentes en réanimation. Les rares études sur le sujet se sont donc concentrées sur ces infections. Concernant les PAVM à E-BLSE, une étude monocentrique rétrospective a comparé les céphalosporines de 3^{ème} génération et les associations pénicilline- inhibiteur de bêta-lactamase (dont fait partie la pipéracilline-tazobactam) aux carbapénèmes (8). Cette étude ne retrouvait pas de différence de mortalité ni de guérison de l'épisode infectieux entre les 2 groupes de traitement malgré un taux inférieur d'antibiothérapie adaptée dans le groupe céphalosporines de 3^{ème} génération. Concernant les bactériémies à E-BLSE, une large étude multicentrique est restée négative ne parvenant pas à prouver la non-infériorité de la pipéracilline-tazobactam comme traitement documenté (et non probabiliste) par rapport au mérépénème (9) mais plusieurs biais de l'étude en limitent l'interprétation comme discuté par notre équipe (10) et par d'autres équipes (11,12). En premier lieu, cette étude n'a pas prouvé la supériorité du mérépénème et doit donc être considérée comme une étude négative. Deuxièmement, les modalités d'administration de la pipéracilline-tazobactam par perfusions courtes de 30 minutes ne permettent pas d'optimiser les paramètres pharmacocinétiques de l'antibiothérapie. Troisièmement, les infections étaient causées, dans 12% des cas, par des β -lactamases de type AmpC non sensibles à la pipéracilline-tazobactam alors que ces patients non E-BLSE auraient pu être exclus comme l'étude s'intéressait au traitement documenté et non au traitement probabiliste. Enfin, la mortalité était supérieure chez les patients ayant eu une antibiothérapie probabiliste comparés aux patients ayant reçu une antibiothérapie probabiliste inadaptée. Les traitements probabilistes utilisés ainsi que les stratégies, chirurgicales ou non, de contrôle de la porte d'entrée de la bactériémie n'étaient pas précisés.

Les stratégies d'épargne des carbapénèmes pourraient également avoir lieu à l'étape du traitement probabiliste. Les patients colonisés par les E-BLSE sont en effet plus à risque d'infections par E-BLSE que les non colonisés et il a donc été proposé de guider le traitement probabiliste des infections acquises en réanimation en fonction du statut de colonisation. Néanmoins, le taux d'infection à E-BLSE reste faible (autour de 15 à 20%) chez les patients colonisés mais représente une cause importante de consommation de carbapénèmes (13–15). Les facteurs de risque identifiés de PAVM à E-BLSE sont le fait d'être colonisé par une *K. pneumoniae* [OR: 60.6; (IC95% 56.33-578.73)] et/ou un *Enterobacter* sp. [OR 10.96 (IC95% : 2.93-41.0)] et un score de SAPS II à l'admission supérieur à 43 [OR 2.81 (IC95% : 1.16-6.79)] (16,17). Malgré l'identification de ces facteurs de risque, la prédiction individuelle par patient de la survenue d'une PAVM à E-BLSE reste très difficile même chez les patients colonisés.

Plusieurs études se sont donc intéressées à la valeur prédictive de la colonisation digestive par E-BLSE. Une première étude a évalué le pronostic de la colonisation digestive sur la colonisation pulmonaire à E-BLSE trouvant une valeur prédictive négative (VPN) excellente [99.2% (IC95% : 98.7;99.6) avant 5 jours de ventilation et 93,4% (IC95% : 91.9;95.0) après 5 jours) mais une valeur prédictive positive (VPP) médiocre [14.5% (IC95% : 12.8; 16.3) et 34.4% (IC95% : 31.4; 37.4) respectivement avant et après 5 jours de ventilation mécanique] (18).

Malgré tout, colonisation pulmonaire n'est pas synonyme d'infection pulmonaire. Une étude rétrospective a montré une VPP de 41,5% et une VPN de 99,4% de la colonisation digestive à E-BLSE pour la survenue de PAVM à E-BLSE résultat confirmé par une autre équipe (VPP : 43,6%, VPN : 97,3%) (19,20). Ces excellentes valeurs prédictives négatives renforcent le fait de ne pas prescrire de carbapénèmes aux patients non porteurs de E-BLSE mais les VPP médiocres n'aident pas à décider du traitement probabiliste adéquat chez ces patients porteurs d'E-BLSE.

Très peu d'études se sont intéressées au traitement probabiliste des infections chez les porteurs d'E-BLSE ; en particulier aucune étude prospective n'existe pour les PAVM. L'étude rétrospective abordant ce sujet ne retrouvait pas de différence en terme de durée de ventilation mécanique, de durée de séjour en réanimation ni de taux de mortalité en réanimation (55.8% vs 50%, $p = 0.48$) entre les PAVM à E-BLSE comparées aux PAVM non à E-BLSE (20). Les études rétrospectives ayant étudié l'impact du traitement probabiliste dans les bactériémies à E-BLSE ne retrouvent pas non plus d'augmentation de la mortalité en fonction de la couverture microbiologique de ce traitement probabiliste (21–23) ce qui est extrêmement rassurant quant à l'inocuité d'une telle stratégie. Le pronostic de ces infections était essentiellement déterminé par des facteurs liés à l'hôte ; ce qui suggère que le portage d'une E-BLSE est probablement le reflet d'une fragilité de l'hôte (24).

Au vu des données de la littérature décrites précédemment, il apparaît logique de s'interroger s'il ne serait pas possible d'épargner l'utilisation de carbapénèmes lors de l'antibiothérapie probabiliste des PAVM survenant chez les patients colonisés au niveau digestif par des E-BLSE en ayant une stratégie d'usage systématique de la pipéracilline-tazobactam.

Cette interrogation est renforcée par les résultats d'une étude ayant évalué l'arrêt du dépistage systématique de la colonisation digestive par E-BLSE, dépistage étant censé guider cette utilisation de carbapénèmes. Ces résultats suggèrent que cette stratégie pourrait permettre de diminuer la consommation de carbapénèmes (75 vs 61 jour-carbapénème pour 1000 patient-jours, $p : 0,01$) sans effet ni sur la survenue d'infections à E-BLSE [OR ajusté : 1.16 (IC95% : 0.38-3.50), $p = 0.79$] ni sur la mortalité en réanimation [SHR : 1.22 (IC95% : 0.93-1.59), $p = 0.15$] (25). Néanmoins, ces résultats provenaient d'une étude de cohorte avant-après monocentrique et doit être confirmée par des études de plus haut niveau de preuve.

2.1.2. LES STRATEGIES A L'ETUDE

Les conditions d'administration de la pipéracilline-tazobactam en réanimation ont été largement décrites. La pipéracilline-tazobactam à l'AMM pour le traitement probabiliste des PAVM survenant chez les patients porteurs d'E-BLSE mais est rarement donnée en probabiliste dans cette indication en pratique courante, les cliniciens préférant le plus souvent utiliser des carbapénèmes. La pipéracilline-tazobactam est largement prescrite dans les PAVM chez les patients non colonisés à E-BLSE avec une efficacité démontrée (5).

Cet antibiotique à action temps-dépendante gagne à être administré en perfusions lentes répétées ou en perfusion continue à la seringue électrique pour optimiser son dosage pharmacocinétique (26).

Un schéma par dose de charge de 4 grammes (g) de pipéracilline / 0,5g de tazobactam puis relais de 16g de pipéracilline / 2g de tazobactam par jour en perfusion continue est optimal pour obtenir des concentrations plasmatiques et alvéolaires adéquates (27,28).

Les conditions d'adaptation posologique à la fonction rénale après les 24 premières heures de traitement sont bien établies par les « Groupes de Prescription et Rein » (GPR). Dans le cas particulier d'hyperclairance rénale, la posologie sera adaptée selon les données actuelles de la littérature (29,30).

La nécessité de l'adaptation de l'antibiothérapie à un antibiotique de spectre plus étroit après obtention de l'antibiogramme ainsi que la durée de traitement de sept jours sont bien établies dans la littérature comme en témoigne une revue récente (4,31).

2.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE ET RESULTATS ATTENDUS

Nous posons l'hypothèse que la stratégie consistant à employer la pipéracilline-tazobactam pour la partie probabiliste du traitement des PAVM chez les patients colonisés au niveau digestif à E-BLSE est efficace.

2.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES

Nous proposons de mener un essai pilote de phase II mono-bras bi-centrique afin d'explorer l'efficacité de la stratégie consistant à employer de la pipéracilline-tazobactam dans le traitement probabiliste des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique survenant chez des patients ayant une colonisation digestive à E-BLSE.

Le choix d'un essai pilote de phase II mono-bras est dicté par le fait que, comme discuté précédemment, peu de données prospectives existent dans la littérature sur l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam dans cette indication précise. Les données rétrospectives ne permettent pas d'envisager directement un essai randomisé de grande ampleur dans lequel la non-infériorité du traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam sera évaluée par rapport à un traitement par carbapénème.

Le recueil de données préliminaires dans une étude de plus petit effectif de phase II est un pré-requis indispensable pour cet essai de non-infériorité ultérieur.

Parmi les différents schémas de phase II mono-bras décrits dans la littérature méthodologique, nous avons choisi un schéma exploratoire descriptif (description des critères de jugement et de leur intervalle de confiance) afin de pouvoir explorer l'efficacité de la stratégie thérapeutique proposée dans un schéma d'essai pilote avec un effectif raisonnable (n=30). En effet, les autres schémas mono-bras classiques existants (de type schéma de Fleming) nécessiteraient des effectifs considérables dans notre contexte spécifique avec une hypothèse sous-jacente de non-infériorité (effectifs trop importants pour les inclure de façon raisonnable dans une étude pilote mono-bras qui par conception ne peut pas donner de preuve définitive pour la stratégie évaluée mais sert à préparer un essai de plus grande taille).

La pipéracilline-tazobactam sera ici utilisée dans le cadre de son AMM de 2008 qui stipule comme indication chez l'adulte, les infections bactériennes locales et/ou systémiques modérées à sévères dans lesquelles la bêta-lactamase est suspectée ou a été détectée, telles que :

- Pneumopathies nosocomiales
- Infections urinaires compliquées (y compris pyélonéphrites)
- Infections intra-abdominales
- Infections de la peau et des tissus mous
- Infections bactériennes chez les patients adultes neutropéniques

Concernant les critères d'inclusion, nous avons choisi d'inclure les patients ayant une colonisation digestive à E-BLSE importée comme acquise car les données de la littérature tout comme des données de notre équipe actuellement soumises ne retrouvent pas de différence en terme de fréquence d'E-BLSE retrouvée comme bactérie causale de PAVM en fonction de cette situation.

L'espèce colonisante E-BLSE ne rentrera pas en compte dans cette étude. Certaines études suggèrent que le fait d'être colonisé par une *K. pneumoniae* ou un *Enterobacter sp.* BLSE pourrait induire un surrisque d'infection à ces mêmes germes BLSE (17,31,32). Cependant, ces données ne sont pas retrouvées par toutes les études et il n'a pas été montré de surmortalité entre les patients infectés par *Escherichia coli* BLSE et *K. pneumoniae* BLSE (24,33). Notre étude étant la première étude prospective sur le sujet, il paraît hasardeux de sélectionner des espèces a priori devant ce faible niveau de preuve.

Par ailleurs, la distinction entre PAVM précoce et tardive est parfois faite dans la littérature pour le choix de l'antibiothérapie probabiliste (5). Cette distinction n'a aucune pertinence et ne s'applique donc pas lorsque l'on sait que les patients sont déjà colonisés au niveau digestif par une E-BLSE, comme c'est le cas pour la population d'étude ciblée ici.

Concernant les critères de non-inclusion, les patients atteints de choc septique sont la portion de patients les plus graves chez qui un retard d'antibiothérapie adaptée pourrait avoir le plus de conséquence. Il paraît donc logique de ne pas les inclure dans une étude de phase II. De plus, une revue récente proposant un arbre décisionnel de traitement des PAVM préconise une prudence particulière chez ces patients atteints de PAVM en choc septique renforçant la décision de ne pas les inclure (4).

Les patients neutropéniques ne sont pas inclus pour la même raison de prudence lors d'un essai de phase II même si une étude récente ne retrouve pas d'influence de l'inadaptation du traitement probabiliste sur la mortalité lors d'une bactériémie à E-BLSE en cas de neutropénie fébrile (32). Nous préférons appliquer un principe de précaution pour cette étude préliminaire.

Les patients ayant déjà reçu de la pipéracilline-tazobactam ou des carbapénèmes lors de leur séjour en réanimation seront inclus car aucune donnée ne permet de prédire la résistance du germe infectant à ces antibiotiques quand ils sont donnés préalablement.

Les données de colonisation digestive connue à un germe résistant (EPC ou *A. baumannii* multi-résistant) ainsi que les données microbiologiques des infections dans l'année précédent sont recueillies de façon systématique à l'entrée en

réanimation et seront donc disponibles lors de la survenue de la PAVM qui a lieu au bout de plusieurs jours d'hospitalisation en réanimation.

De la même façon, les antécédents allergiques sont recueillis de façon systématique à l'admission en réanimation. Le choix de prendre en compte une allergie prouvée soit par tests allergologiques soit par anamnèse avec atteinte cutanéomuqueuse est justifiée par le fait qu'éviter les pénicillines simplement quand le patient est « étiqueté » allergique à la pénicilline conduit à une morbidité importante (33–37).

Dans le cadre d'un essai pilote de phase II évaluant l'efficacité de la stratégie consistant à employer de la pipéracilline-tazobactam dans le traitement probabiliste des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique survenant chez des patients ayant une colonisation digestive à E-BLSE, il est nécessaire de prendre un critère de jugement principal ayant une forte pertinence clinique comme la mortalité en réanimation qui est un critère de jugement objectif, à haute pertinence clinique et largement validé et accepté dans les études en réanimation. **Le critère de jugement de cet essai évalue donc la stratégie globale** (traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam puis traitement adapté en fonction de l'antibiogramme). En effet, la phase probabiliste et la phase documentée sont toutes les 2 importantes pour l'efficacité du traitement et la sélection de résistance aux antibiotiques. Le traitement probabiliste initial a un rôle important pour le pronostic du patient mais reste peu codifié dans les recommandations sans argument de haut niveau de preuve scientifique. Le traitement documenté est lui mieux codifié et fait partie intégrante de la pratique courante car il permet, tout en garantissant la couverture microbiologique du germe isolé par l'antibiotique choisi, de diminuer l'apparition et/ou la sélection de résistances aux antibiotiques de plus large spectre utilisés en traitement probabiliste en utilisant un antibiotique de spectre plus étroit(31).

Ce critère de jugement permet, d'une part, de comparer les résultats de l'essai mono-bras aux connaissances théoriques de la littérature et, d'autre part, de préparer les hypothèses pour un futur essai clinique randomisé testant l'hypothèse de non-infériorité.

Tous les participants inclus dans cet essai recevront un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam à partir de J0. L'envoi d'un prélèvement respiratoire de type aspiration trachéale en bactériologie sera systématique avant l'instauration de l'antibiothérapie par pipéracilline-tazobactam. Le choix de la réalisation d'un lavage bronchoalvéolaire sera laissé à la discrétion des praticiens en charge du patient comme cela est réalisé en pratique courante. Dès obtention des résultats de l'antibiogramme (le plus souvent vers J3), le traitement antibiotique sera adapté selon les procédures de routine pour choisir le traitement ayant une bonne diffusion pulmonaire et le spectre d'action le plus étroit possible, comme cela est recommandé en pratique courante.

2.4. RAPPORT BENEFICE/RISQUE

Les risques attendus sont faibles compte tenu des éléments suivants :

- Le traitement utilisé est largement décrit dans la littérature et utilisé quotidiennement en pratique clinique depuis plus de 15 ans (21-29). Le traitement des pneumopathies nosocomiales modérées à sévères dans lesquelles la bêta-lactamase produite par la bactérie est suspectée ou a été détectée entre parfaitement dans l'AMM de 2008 de la pipéracilline-tazobactam.
- Les infections à E-BLSE restent rares même chez les patients colonisés à E-BLSE (10 à 20% des PAVM sont effectivement causées par une E-BLSE chez les patients colonisés à E-BLSE) (13–15)

Un doute pourrait subsister sur la non couverture microbiologique du germe infectant par la pipéracilline-tazobactam. Néanmoins, plusieurs éléments sont très rassurants à ce sujet là :

- Concernant les patients infectés en réanimation par une E-BLSE, les données épidémiologiques recueillies dans le service en 2015 retrouvaient un taux de sensibilité des E-BLSE à la pipéracilline-tazobactam de 90% (travail soumis à une revue de grade B). Ces résultats sont en accord avec la littérature européenne. Au final, seulement 1 à 2% des patients colonisés au niveau digestif par E-BLSE ont une PAVM causées par une E-BLSE résistante à la tazocilline.
- Les études rétrospectives, citées précédemment, ayant étudié l'impact du traitement probabiliste dans les bactériémies à E-BLSE ne retrouvent pas non plus d'augmentation de la mortalité (21–23) entre ceux ayant eu une antibiothérapie probabiliste adaptée ou non ce qui est extrêmement rassurant quant à l'inocuité d'une telle stratégie.
- Le pronostic de ces infections était essentiellement déterminé par des facteurs liés à l'hôte ce qui reflète que le portage d'une E-BLSE est probablement le reflet d'une fragilité de l'hôte (24).

Les bénéfices en regard paraissent bien plus importants. En effet, l'absence d'utilisation des carbapénèmes diminue la sélection de bactéries résistantes aux carbapénèmes chez le patient, permettant de préserver l'efficacité des carbapénèmes en cas d'infection future et d'éviter aux patients la lourdeur d'un isolement contact intensif qui peut avoir des répercussions sur la prise en charge mais également sur le plan psychologique (38,39).

Sur le plan des bénéfices collectifs, l'intérêt de préserver l'efficacité des carbapénèmes en ne les utilisant que dans des situations de dernier ressort a été maintes fois souligné par l'OMS qui redoute l'avènement d'un « monde post-antibiotique » à court ou moyen terme.

2.5. RETOMBÉES ATTENDUES

L'originalité de notre étude est de se focaliser sur les patients porteurs rectaux d'E-BLSE. En effet, les études ont permis de répondre quant à la stratégie d'antibiothérapie probabiliste pour les patients non porteurs mais aucune étude prospective ne s'est concentrée sur la prise en charge de ces patients colonisés.

Dans le cas d'une confirmation de la sécurité d'emploi de la pipéracilline-tazobactam, bêta-lactamine à spectre plus étroit par rapport aux carbapénèmes, chez les patients colonisés à E-BLSE non en choc septique ayant une PAVM, cette étude permettrait la réalisation d'un essai de plus grande ampleur contrôlé, randomisé de phase III pour confirmer la non-infériorité de la pipéracilline-tazobactam par rapport au méropénème dans cette indication. Cet essai de phase III futur pourra faire l'objet d'une demande de financement PHRC interrégional ou national si les résultats du présent essai pilote sont prometteurs.

A terme, cela pourrait permettre de diminuer l'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes en réanimation qui sont connues pour être pourvoyeuses de surcoûts dans la prise en charge (dépistage régulier, personnel dédié, précautions d'hygiène renforcée, durée de séjour prolongée, ...). Cela conduirait également à remettre en question la pertinence de la recherche par écouvillon rectal de ces E-BLSE, autre sujet de débat actuel.

Cela permettrait également de diminuer les coûts engendrés par les patients porteurs d'E-BLSE en arrêtant le dépistage systématique de la colonisation digestive à E-BLSE, débat actuel au sein de la communauté de réanimation.

2.6. JUSTIFICATION DU FAIBLE NIVEAU D'INTERVENTION

La procédure à l'étude dans cette recherche ne comporte que des risques et des contraintes minimales. La mortalité élevée attendue dans la population d'étude reflète le risque vital des patients avec PAVM en réanimation, mais le risque de l'essai lui-même est jugé minime, compte tenu des éléments suivants :

- Le traitement utilisé est largement décrit dans la littérature et utilisés quotidiennement en pratique clinique depuis plus de 15 ans (21-29). Le traitement des pneumopathies nosocomiales modérées à sévères dans lesquelles la bêta-lactamase produite par la bactérie est suspectée ou a été détectée entre parfaitement dans l'AMM de 2008 de la pipéracilline-tazobactam.
- Les infections à E-BLSE restent rares même chez les patients colonisés à E-BLSE (10 à 20% des PAVM sont effectivement causées par une E-BLSE chez les patients colonisés à E-BLSE) (13-15)

Un doute pourrait subsister sur la non couverture microbiologique du germe infectant par la pipéracilline-tazobactam. Néanmoins, plusieurs éléments sont très rassurants à ce sujet là :

- Concernant les patients infectés en réanimation par une E-BLSE, les données épidémiologiques recueillies dans le service en 2015 retrouvaient un taux de sensibilité des E-BLSE à la pipéracilline-tazobactam de 90% (40). Ces résultats sont en accord avec la littérature européenne.
- Les études rétrospectives, citées précédemment, ayant étudié l'impact du traitement probabiliste dans les bactériémies à E-BLSE ne retrouvent pas non plus d'augmentation de la mortalité (21-23) ce qui est extrêmement rassurant quant à l'inocuité d'une telle stratégie.
- Le pronostic de ces infections était essentiellement déterminé par des facteurs liés à l'hôte ce qui reflète que le portage d'une E-BLSE est probablement le reflet d'une fragilité de l'hôte (24).

De plus, malgré ce risque considéré comme minime, nous avons fait le choix par prudence de mettre en place un comité indépendant de surveillance pour cet essai.

3. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

3.1. OBJECTIF PRINCIPAL

L'objectif principal est d'estimer la mortalité en réanimation des patients ayant une colonisation digestive à E-BLSE, bénéficiant d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique.

3.2. OBJECTIFS SECONDAIRES

Les objectifs secondaires de cette étude sont :

- Explorer l'efficacité clinique d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE
- Explorer l'efficacité biologique d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE
- Explorer la couverture microbiologique d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE
- Etudier la survenue d'effets indésirables lors d'une stratégie de traitement incluant l'utilisation de la pipéracilline-tazobactam comme traitement probabiliste des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE

4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE

Il s'agit d'un essai clinique pilote mono-bras de phase II bicentrique.

5. CRITERES D'ÉLIGIBILITE

5.1. CRITERES D'INCLUSION

- Patient majeur hospitalisé en service de Réanimation

- Porteur sur l'écouvillon rectal (d'admission ou de suivi) d'une E-BLSE

La recherche de colonisation par une E-BLSE se fera selon les mêmes modalités de pratique courante (EUCAST 2019 et CA-SFM 2019) aux laboratoires des hôpitaux de Pellegrin et de Bayonne, à savoir également d'un écouvillon rectal sur une gélose contenant du céfotaxime à la concentration de 2mg/L(chromID ESBL®) puis incubation pendant 16 à 24 heures à 37°C. Cet écouvillon rectal est effectué à l'admission du patient puis tous les 7 jours lors de son hospitalisation en réanimation. La présence d'une E-BLSE sera confirmée par le test de détection MAST AMPC&ESBL D68C® (Mast Group). L'identification de l'espèce bactérienne sera réalisée par spectrométrie de masse (Maldi Biotyper Microflex®, Brucker). La recherche sera faite à l'admission puis tous les 7 jours lors du séjour en réanimation.

- Suspect de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

La suspicion de PAVM se fera devant les critères suivant (41,42) :

- Ventilation mécanique depuis au moins 48 heures par intubation oro-trachéale ou trachéostomie
- Radiographie thoracique avec des infiltrats nouveaux, progressifs ou persistant, une consolidation ou une abcédation
- Au moins un des signes d'inflammation suivant : température supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C sans autre cause retrouvée, leucopénie < 4000 leucocytes/mm³ ou leucocytose > 12 000 leucocytes/mm³
- Au moins un des signes respiratoires suivants : augmentation des besoins en FiO₂ supérieure ou égale à 0,20 (20 points) par rapport au niveau de base 2 jours consécutifs et/ou augmentation de la pression expiratoire positive (PEP) supérieure ou égale à 3mmHg 2 jours consécutifs.

- Consentement (selon procédure d'urgence)

Inclusion en situation d'urgence

Les patients atteints de PAVM sont des personnes intubées, le plus souvent sédatéés en réanimation et donc dans l'incapacité de consentir. En cas de diagnostic de PAVM, le début d'un traitement antibiotique est une urgence thérapeutique. Conformément à la législation en vigueur en cas de situation d'urgence, les patients seront inclus sans accord préalable de leur part. Ils seront informés dès que cela sera possible et apte à recevoir une information claire, loyale et appropriée. Si un proche est présent lors de l'inclusion, son accord sera sollicité et recueilli pour décision de l'inclusion du patient. Si aucun proche n'est présent, le patient sera inclus mais l'information et l'accord d'un proche seront recherchés dès que possible.

5.2. CRITERES DE NON INCLUSION

- Choc septique.

Les critères Sepsis-3 définissent un choc septique par un sepsis (dysfonction d'organe liée à la réponse inflammatoire dérégulée à une infection) associé à la nécessité d'utiliser des vasopresseurs pour obtenir une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mmHg et à une lactatémie supérieure à 2mmol/L malgré un remplissage vasculaire adapté (43).

- Neutropénie < 500/mm³

- Colonisation connue dans les 6 mois précédent à une bactérie systématiquement résistante à la piperacilline-tazobactam (EPC ou *A. baumannii* multirésistant)

La résistance à la tazocilline est définie par les recommandations européennes EUCAST 2019 par une concentration minimale inhibitrice (CMI) supérieure à 16mg/L.

- Infection connue dans les 6 mois précédent causée par une bactérie résistante à la piperacilline-tazobactam

La résistance à la tazocilline est définie par les recommandations européennes EUCAST 2019 par une concentration minimale inhibitrice (CMI) supérieure à 16mg/L.

- Episode de PAVM survenant chez un patient ayant reçu de la piperacilline-tazobactam dans les 10 derniers jours.

- Allergie prouvée ou avec une suspicion clinique forte à la pénicilline ou au tazobactam

- Femme enceinte ou allaitante

- Patients sous mesures de protection (curatelle, tutelle, sauvegarde de justice).

- Personnes incarcérées

- Limitation ou arrêt des thérapeutiques actives

- Personne non affiliée ou non bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale

5.3. FAISABILITE ET MODALITES DE RECRUTEMENT

Cet essai sera mené dans les services de réanimation de 2 centres : CHU de Bordeaux et hôpital de Bayonne. Le service de Bayonne est habitué à participer à des protocoles de recherche et fait partie du réseau national de surveillance des infections en réanimation adulte (réseau REA-RAISIN).

Selon les données PMSI et de recueil interne du service de Médecine Intensive Réanimation de l'hôpital Pellegrin du CHU de Bordeaux, environ 1200 patients par an sont hospitalisés dans ce service avec, en 2015, 9,4% de patients porteurs rectaux d'E-BLSE soit environ 112 patients porteurs d'E-BLSE par an et 224 en 2 ans. Parmi ces 224 patients E-BLSE positifs, environ 134 (60%) sont ventilés mécaniquement de façon invasive. Dans le service, en accord avec les données de la littérature, environ 10% des patients ventilés de façon invasive en réanimation développent une PAVM au bout d'une durée médiane de 6 à 8 jours soit environ 26 PAVM attendues en 2 ans chez des patients porteurs rectaux d'E-BLSE.

Selon les données PMSI et de recueil interne du service de Réanimation chirurgicale de l'hôpital Pellegrin du CHU de Bordeaux, environ 900 patients par an sont hospitalisés dans ce service avec 350 épisodes de PAVM chez environ 90 patients par an soit 180 patients concernés en 2 ans. Le nombre plus important d'épisodes de PAVM en réanimation chirurgicale s'explique par le fait qu'une plus grande proportion de patients est intubée. En prenant un taux de colonisation digestive à E-BLSE de 9% également, environ 16 patients colonisés au niveau digestif à E-BLSE auraient une PAVM en 2 ans.

Selon les données de recueil interne effectué par le service de réanimation polyvalente de l'hôpital de Bayonne dans le cadre de la participation au registre national REA-RAISIN, les moyennes suivantes sur les 5 dernières années ont pu être obtenues :

- 53 patients colonisés par une E-BLSE/an soit 106 en 2 ans
- 69% de patients ventilés mécaniquement soit 73 patients colonisés par une E-BLSE ventilés mécaniquement en 2 ans
- 12% de PAVM soit 8 PAVM survenant chez des patients colonisés par une E-BLSE en 2 ans

On s'attend donc à ce que 50 patients soient incluables dans les services de médecine intensive réanimation et de réanimation chirurgicale de l'hôpital Pellegrin et de réanimation polyvalente de l'hôpital de Bayonne sur une période de 2 ans. L'essai inclura 30 patients, donc la faisabilité semble adéquate. Néanmoins, dans un contexte de réanimation, il est nécessaire de garder à l'esprit que certaines familles peuvent être frileuses à l'idée de participer à un protocole de recherche clinique et que la participation de médecins « extérieurs » au service au planning de garde peut augmenter le nombre de patients non inclus. Cela justifie la nécessité de réaliser cette étude dans ces 3 services pour avoir un potentiel d'inclusion suffisant.

Sur le plan scientifique, les services participant sont des services ayant déjà une dynamique de recherche sur le sujet :

- Le service de médecine intensive réanimation de l'hôpital Pellegrin possède une expertise sur le traitement des pneumopathies associées aux soins en réanimation (44,45) et sur le sujet des E-BLSE ((46,47) avec récemment la publication d'une revue systématique sur la pertinence de la réalisation d'un dépistage systématique de la colonisation digestive à E-BLSE en réanimation (48) et un article sur la dissémination des E-BLSE et le lien colonisation-infection pour les PAVM (40).
- Le service de réanimation chirurgicale de l'hôpital Pellegrin a également une expertise dans le management du traitement des infections sévères en particulier concernant la pipéracilline-tazobactam (29,30,49).
- Le service de Réanimation polyvalente de Bayonne participe depuis 2015 au projet Aquilit porté par la cellule Aquitaine Microbiologie de l'université de Bordeaux (auquel le service de médecine intensive réanimation de l'hôpital Pellegrin participe également) qui vise à comparer les profils de résistance des bactéries isolées sur le littoral aquitain à ceux des bactéries isolées en médecine de ville et en réanimation en Aquitaine.

Ces éléments assurent un degré d'expertise et une habitude de travail sur le sujet de ces 3 services renforçant leur implication dans un tel protocole.

Le nombre de patients perdus de vue devrait être quasiment nul car le critère de jugement principal s'évalue au moment de la sortie du patient de la réanimation et donc du service dans lequel le patient a été inclus. Le transfert d'une réanimation à une autre de ce type de patient est extrêmement rare et le service de médecine intensive réanimation est le service de l'hôpital tertiaire recevant ce type de patient en dernier recours dans les cas les plus compliqués.

Selon les données internes recueillies dans le service, les patients allergiques à la pénicilline ou au tazobactam de façon prouvée par test allergologique ou anamnèse et les femmes enceintes ou allaitantes représentent moins de 5% des patients. Sur les 2 dernières années, nous n'avons eu qu'un patient colonisé à EPC et aucun patient colonisé à *A. baumannii* multirésistant.

La proportion de patients en choc septique au moment du diagnostic de PAVM est d'environ 10% sur les 2 dernières années dans notre service.

En ajoutant les refus ou retraitement de consentement, nous estimons que 20% des patients remplissant les critères d'inclusion ne seront pas inclus ou perdus de vue.

Les patients étant hospitalisés en réanimation lors de leur inclusion, le screening et l'inclusion seront réalisés directement par les médecins hospitaliers travaillant dans l'unité.

Cette étude ne nécessite pas de surcoût de matériel en particulier pour les analyses microbiologiques et pour les traitements. Les dépenses de prise en charge sont constituées uniquement des dépenses relatives aux soins courants.

6. STRATEGIE(S) DE LA RECHERCHE

6.1. STRATEGIE ETUDIEE

- Administration d'un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam entre J0 et l'obtention de l'antibiogramme

Les conditions d'administration de la pipéracilline-tazobactam en réanimation ont été largement décrites.

Cet antibiotique à action temps-dépendante gagne à être administré en perfusions lentes répétées ou en perfusion continue à la seringue électrique pour optimiser son dosage pharmacocinétique (26).

Un schéma par dose de charge de 4 grammes (g) de pipéracilline / 0,5g de tazobactam puis relais de 16g de pipéracilline / 2g de tazobactam par jour en perfusion continue est optimal pour obtenir des concentrations plasmatiques et alvéolaires adéquates (27,28).

Les conditions d'adaptation posologique à la fonction rénale après les 24 premières heures de traitement sont bien établies par les « Groupes de Prescription et Rein » (GPR) et relèvent de la pratique quotidienne. Dans le cas particulier d'hyperclairance rénale, la posologie sera adaptée selon les données actuelles de la littérature (29,30).

Le résumé des caractéristiques du produit préconise la dilution de 4g de pipéracilline / 0,5g de tazobactam dans 50 millilitres de NaCl 0,09% en seringue électrique sur 6 heures 4 fois par jour.

Les contre-indications habituelles de l'emploi de la pipéracilline-tazobactam sont respectées par les critères de non-inclusion à savoir l'hypersensibilité à la pipéracilline ou au tazobactam, la grossesse et l'allaitement ainsi que l'âge inférieur à 2 ans.

La pipéracilline-tazobactam sera utilisée en monothérapie car l'association aux quinolones n'est plus recommandée en probaliste devant le niveau de résistance important aux quinolones et que les aminosides ont une pénétrance médiocre d'environ 10% au niveau pulmonaire (50).

L'escalade thérapeutique de la pipéracilline-tazobactam au méropénème sera réalisée chez les patients chez qui un choc septique selon les critères Sepsis-3 apparaît entre l'inclusion et l'obtention d'une documentation microbiologique et chez les patients chez qui l'état respiratoire menace le pronostic vital à court terme.

- Après l'obtention de l'antibiogramme

Administration de l'antibiotique efficace ayant une bonne diffusion pulmonaire et le spectre d'action le plus étroit possible selon la pratique de routine. Les antibiotiques les plus couramment utilisés dans cette situation sont les β -lactamines de spectre plus étroit comme l'amoxicilline ou l'association amoxicilline-acide clavulanique ou les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération (céfotaxime ou céfépime) (31).

La nécessité de l'adaptation de l'antibiothérapie à un antibiotique de spectre plus étroit après obtention de l'antibiogramme ainsi que la durée de traitement de sept jours sont bien établies dans la littérature comme en témoigne une revue récente (4).

6.2. CIRCUIT DES PRODUITS

La pipéracilline-tazobactam sera délivrée par la pharmacie hospitalière comme dans le cadre du soin courant car c'est un médicament usuel et l'étude est ouverte. Le même circuit s'applique aux traitements antibiotiques administrés après obtention de l'antibiogramme.

7. CRITERES DE JUGEMENT

7.1. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Mortalité en réanimation : proportion de patients décédés durant leur séjour en réanimation

7.2. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES

Les critères de jugement secondaires se rapportant à l'objectif d'explorer l'**efficacité clinique** d'un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam dans le traitement des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE sont :

- **Proportion de participants décédés entre J0 et J28**
- **Proportion de participants décédés entre J0 et J90**
- **Proportion de participants dont la mortalité est attribuable à la PAVM**

Ce critère de jugement n'étant pas défini par des critères objectifs dans la littérature, il sera confirmé par un comité de validation des événements dont les membres sont indépendants des investigateurs de l'étude.

- **Durée médiane de ventilation mécanique** : nombre de jours avec ventilation mécanique par intubation oro-trachéale ou trachéostomie entre l'inclusion et la sortie de réanimation.
- **Durée médiane de séjour en réanimation** : nombre de jours entre l'entrée et la sortie du patient en réanimation
- **Efficacité clinique à J3 et J7** : proportion de patients guéris de l'infection à J3 et à J7 de l'inclusion

L'efficacité clinique sera définie par l'association de la survie, de la stabilité hémodynamique, d'un score de SOFA stable ou en amélioration ET d'un rapport PaO₂/FiO₂ stable ou en amélioration (41,51).

- **Proportion de patients nécessitant une escalade du traitement probabiliste de la pipéracilline-tazobactam au méropénème.**

L'escalade thérapeutique de la pipéracilline-tazobactam au méropénème sera réalisée chez les patients chez qui un choc septique selon les critères Sepsis-3 apparaît entre l'inclusion et l'obtention d'une documentation microbiologique et chez les patients chez qui l'état respiratoire menace le pronostic vital à court terme.

- **Proportion de patients ayant un nouvel épisode de PAVM entre la fin du traitement de l'étude et 48 heures après leur extubation.**

La récurrence de PAVM sera diagnostiquée selon les mêmes critères diagnostiques que ceux pour le diagnostic de PAVM à l'inclusion (41,42) :

- Ventilation mécanique depuis au moins 48 heures par intubation oro-trachéale ou trachéostomie
- Radiographie thoracique avec des infiltrats nouveaux, progressifs ou persistant, une consolidation ou une abcédation
- Au moins un des signes d'inflammation suivant : température supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C sans autre cause retrouvée, leucopénie < 4000 leucocytes/mm³ ou leucocytose > 12 000 leucocytes/mm³

Au moins un des signes respiratoires suivants : augmentation des besoins en FiO₂ supérieure ou égale à 0,20 (20 points) par rapport au niveau de base 2 jours consécutifs et/ou augmentation de la pression expiratoire positive (PEP) supérieure ou égale à 3mmHg 2 jours consécutifs

Le critère de jugement secondaire se rapportant à l'objectif d'explorer l'**efficacité biologique** d'un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam dans le traitement des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE est :

- **Cinétique de la concentration plasmatique de procalcitonine entre J0 et J3** : pourcentage de variation de la valeur de la PCT exprimée en microgramme par litre (µg/L) entre le jour de l'inclusion (J0) et J3

Les critères de jugement secondaires se rapportant à l'objectif d'explorer la **couverture microbiologique** d'un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam dans le traitement des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE sont :

- **Proportion de patients ayant un germe isolé sur les prélèvements respiratoires effectués pour le diagnostic de l'épisode de PAVM avant introduction du traitement de l'étude (pipéracilline-tazobactam) sensible à la pipéracilline-tazobactam selon les critères EUCAST 2019.**

Un isolat sera considéré comme résistant si ayant une CMI supérieure à 16mg/L, intermédiaires si la bactérie est une entérobactérie avec une CMI supérieure à 8 mais inférieure à 16mg/L et sensible dans les autres cas

- **Proportion de patients ayant un germe isolé sur les prélèvements respiratoires effectués pour le diagnostic de l'épisode de PAVM avant introduction du traitement de l'étude (pipéracilline-tazobactam) sensible au méropénème selon les critères EUCAST 2019.**

Un isolat sera considéré comme résistant au méropénème si ayant une CMI supérieure à 8 mg/L. Les autres isolats seront considérés sensibles à l'exception des bactéries à Gram négatif ayant une CMI supérieure à 2 mais inférieure ou égale à 8 mg/L qui seront considérés intermédiaires.

- Proportion de patients ayant une PAVM documentée à E-BLSE.

Le critère de jugement secondaire se rapportant à l'objectif d'étudier la survenue d'effets indésirables lors d'un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam dans le traitement des PAVM survenant chez des patients ayant une colonisation rectale à E-BLSE est :

- **Proportion de patient ayant eu un ou plusieurs événement(s) indésirable(s) lié(s) ou probablement lié(s) au traitement par pipéracilline-tazobactam**

8. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

8.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE

- Durée de la période d'inclusion : 24 mois
- Durée de participation de chaque participant : 90 jours
- Durée totale de la recherche : 27 mois

8.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PARTICIPANT

	Inclusion J 0	Evaluation J3	Evaluation J7	Evaluation à la sortie de réanimation	Evaluation à J28	Evaluation à J90
Consentement éclairé (S)	✓					
Début du traitement de l'essai	✓					
Mortalité (S)				✓	✓	✓
Durée de ventilation mécanique (S)				✓		
Durée de séjour en réanimation (S)				✓		
Récidive de la PAVM (S)				✓		
Efficacité clinique (S) dont les paramètres biologiques suivant : gaz du sang artériels avec dosage des lactates artériels, bilirubénémie, taux de plaquettes et créatininémie (S)	✓	✓	✓			
Evenements indésirables (S)						
Dosage de la concentration plasmatique de la procalcitonine	✓	✓				
Prélèvement respiratoire envoyé au laboratoire de microbiologie (S)	✓					
Dosage des β HCG (S)	✓					

8.3. INCLUSION ET RECUEIL DES DONNEES

8.3.1. RECUEIL DU CONSENTEMENT

Notre étude se déroule en réanimation chez des patients atteints de PAVM intubés et sédatisés et donc dans l'incapacité de consentir. De plus, l'initiation d'un traitement antibiotique lors du diagnostic de PAVM est une urgence thérapeutique.

Conformément à la législation en vigueur en cas de situation d'urgence, les patients seront inclus selon la procédure d'inclusion en situation d'urgence sans accord préalable de leur part. Ils seront informés dès que cela sera possible et qu'ils seront aptes à recevoir une information claire, loyale et appropriée. Si un proche est présent lors de l'inclusion, son accord sera sollicité et recueilli pour décision de l'inclusion du patient. Si aucun proche n'est présent, le patient sera inclus mais l'information et l'accord d'un proche seront recherchés dès que possible.

En cas de refus du patient ou de son proche, toutes les données recueillies en urgence seront immédiatement détruites.

En tout état de cause, dès que cela est possible, l'investigateur informe le participant et répond à toutes ses questions concernant l'objectif, la nature des contraintes, les risques prévisibles et les bénéfices attendus de la recherche. Il précise également les droits du participant dans le cadre d'une recherche impliquant la personne humaine et vérifie les critères d'éligibilité.

Si un consentement écrit est possible, l'investigateur est responsable de l'obtention du consentement éclairé expresse du participant. Le formulaire de consentement doit être signé AVANT LA REALISATION DE TOUT EXAMEN CLINIQUE OU PARACLINIQUE NECESSITE PAR LA RECHERCHE.

Si le participant ou son (sa) proche donne son accord de participation, ce dernier et l'investigateur inscrivent leurs noms et prénoms en clair, datent et signent le formulaire de consentement en deux exemplaires originaux.

Un exemplaire original de la note d'information et du consentement signé est remis au participant.

L'autre exemplaire original est conservé par l'investigateur (même en cas de déménagement du participant pendant la durée de la recherche) dans un lieu sûr inaccessible à des tiers.

8.3.2. DEROULEMENT DU RECUEIL DES DONNEES

Les patients étant inclus lors de leur séjour en réanimation et les données cliniques, paracliniques et microbiologiques à recueillir étant des données relevées en routine dans le cadre de la prise en charge courante des patients, il n'y a pas lieu de prévoir de visite particulière. Les investigateurs du protocole de recherche clinique rempliront le dossier médical habituel du patient et les examens paracliniques dans le cadre de la prise en charge habituelle. L'attaché de recherche clinique remplira le formulaire à l'inclusion, J4, J8 et à la sortie du patient de réanimation.

La mortalité à J28 et celle à J90 seront déterminées soit par la connaissance du décès avant la sortie de réanimation, soit par la connaissance du statut d'hospitalisation du patient dans un autre service que la réanimation soit par appel téléphonique du médecin traitant du patient. L'appel du patient ou de sa famille ne sera réalisé qu'en dernier recours.

8.4. ABANDON ET RETRAIT DE CONSENTEMENT

Le participant qui souhaite abandonner ou retirer son consentement de participation à la recherche (comme il est en droit de le faire à tout moment) n'est plus suivi dans le cadre du protocole, mais doit faire l'objet de la meilleure prise en charge possible compte tenu de son état de santé et de l'état des connaissances du moment.

Un **abandon** est une décision d'un participant inclus de faire valoir son droit d'interrompre sa participation à une recherche, à tout moment au cours du suivi, sans qu'il n'encoure aucun préjudice de ce fait et sans avoir à se justifier.

Un **retrait de consentement** est une décision d'un participant de revenir sur sa décision de participer à une recherche et de faire valoir son droit d'annuler son consentement éclairé, à tout moment au cours du suivi et sans qu'il n'encoure aucun préjudice de ce fait et sans avoir à se justifier.

L'investigateur doit identifier la cause de l'abandon/du retrait et évalue s'il est possible de recueillir la variable sur laquelle porte le critère de jugement principal au moment de l'abandon/du retrait. Les abandons/retraits doivent être notifiés rapidement au centre investigateur coordonnateur, au promoteur et au centre de méthodologie et de gestion des données. Les raisons et la date d'abandon/de retrait doivent être documentées dans le cahier d'observation et dans le dossier médical du participant.

8.5. REGLES D'ARRET DE LA RECHERCHE

Fin de la recherche ou arrêt prévu de la recherche : terme de la participation de la dernière personne qui se prête à la recherche aussi appelé dernière visite du dernier participant inclus dans la recherche (toute autre définition doit être mentionnée dans le protocole).

Arrêt anticipé de la recherche : la recherche clinique est arrêté (définitivement) de façon anticipée.

8.6. DEVIATIONS AU PROTOCOLE

Les déviations peuvent concerner tous les aspects d'un protocole de recherche : processus d'inclusion, suivi, mesure des critères de jugement, traitements. Toutes doivent être documentées par l'investigateur et discutées en Conseil Scientifique.

Seuls les abandons entraînent un arrêt du suivi. Même en cas de déviation au protocole, le suivi du participant doit être mené jusqu'au terme prévu dans le protocole.

8.6.1. ARRET PREMATURE ET DEFINITIF DE LA STRATEGIE DE LA RECHERCHE

Un participant est considéré en arrêt de procédure/stratégie quand il l'arrête avant la date prévue dans le protocole. Les participants en arrêt prématuré continuent à être suivis comme prévu par le protocole. En aucun cas, le suivi prévu ne doit être modifié.

Le participant qui arrête la stratégie doit faire l'objet de la meilleure prise en charge possible compte tenu de son état de santé et de l'état des connaissances du moment.

8.6.2. PARTICIPANT PERDU DE VUE

Un participant est considéré comme perdu de vue quand il arrête le suivi prévu dans le cadre du protocole sans raison connue de l'investigateur, de sorte que le recueil des données ne peut plus être effectué comme prévu.

Les participants perdus de vue doivent faire l'objet d'une recherche active de la part de l'investigateur.

8.6.3. PARTICIPANT INCLUS A TORT

Un participant est considéré comme inclus à tort lorsqu'il a effectivement été inclus dans la recherche alors qu'il ne vérifiait pas tous les critères d'éligibilité. Les participants inclus à tort doivent faire l'objet d'une discussion en Conseil Scientifique. Ils doivent continuer à être suivis comme prévu par le protocole jusqu'à ce qu'une décision soit prise par le Conseil Scientifique.

8.7. RISQUES ET CONTRAINTES MINIMES LIEES A LA RECHERCHE ET INDEMNISATION EVENTUELLE DES PARTICIPANTS

La personne incluse ne pourra pas participer à un autre protocole de recherche entrant dans la définition des recherches impliquant la personne humaine de type 1 et 2 pendant la durée de sa participation à cette étude (3 mois). En revanche, elle pourra participer à des projets entrant dans la définition des recherches impliquant la personne humaine de type 3 ou n'impliquant pas la personne humaine (recueil de données cliniques *a posteriori* par exemple).

Le protocole ne prévoit pas d'indemnisation des participants.

9. GESTION DES ÉVÉNEMENTS INDÉSIRABLES / EFFETS INDESIRABLES / INCIDENTS

Les événements indésirables / effets indésirables / incidents seront à déclarer aux différents circuits de vigilances sanitaires applicables à chaque produit ou pratique concernée (vigilance du soin, pharmacovigilance, matériovigilance, hémovigilance, cosmétovigilance...) en conformité avec la réglementation en vigueur.

Les déclarants doivent spécifier que le participant est inclus dans un essai clinique et identifier précisément l'essai clinique concerné.

Si l'investigateur a connaissance d'une atteinte à la sécurité des patients dans le cadre de la recherche, il doit en informer sans délai le promoteur.

10. ASPECTS STATISTIQUES

10.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE

Dans les études observationnelles récentes, la proportion de patients colonisés à E-BLSE ayant une PAVM étant décédés durant leur séjour en réanimation était entre 55 et 60% (19,20). Avec la stratégie comprenant un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam, on espère observer des proportions similaires à ce qui est connu en routine, donc un taux de mortalité en réanimation d'environ 60% .

Sous l'hypothèse d'une mortalité observée de 60%, l'inclusion de 30 patients (potentiel de recrutement comme explicité en chapitre 5.3) permettrait de montrer une mortalité supérieure à 40% - l'intervalle de confiance à 95% selon une loi binomiale exacte étant [41% ; 77%] (logiciel R, package binom).

10.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES

10.2.1. STRATEGIE D'ANALYSE

Les données seront analysées par le biostatisticien du Centre de Méthodologie et de Gestion des données du CHU de Bordeaux (USMR).

Tous les participants inclus dans l'essai seront décrits dans le rapport d'analyse. Cependant, compte tenu du caractère exploratoire de l'étude, toutes les analyses des critères de jugement seront effectuées sur les participants ayant effectivement débuté un traitement probabiliste par pipéracilline-tazobactam et sur données disponibles : aucune stratégie de remplacement des données manquantes ne sera effectuée.

Toutes les comparaisons seront réalisées avec une erreur de type I à 5%.

10.2.2. METHODES STATISTIQUES DESCRIPTIVES

Les variables qualitatives seront décrites en termes d'effectif, de pourcentage et d'intervalle de confiance à 95% selon la loi binomiale exacte.

Les variables quantitatives seront décrites en termes d'effectif, moyenne, écart-type, médiane, étendue, 1^{er} et 3^{ème} quartiles.

10.2.3. METHODES STATISTIQUES COMPARATIVES

Les variables qualitatives pourront être comparées par le test du Chi-deux, du Chi-deux corrigé ou de Fisher exact, selon les valeurs des effectifs attendus sous l'hypothèse d'indépendance. Des modèles de régression logistique ou polytomique pourront être utilisés afin de prendre en compte les variables d'ajustement si nécessaire. L'hypothèse de log-linéarité de l'association sera systématiquement vérifiée.

Les variables quantitatives pourront être comparées par le test de Student si les conditions de validité du test sont respectées (distribution normale, variances homogènes). Si les variances sont inégales, on utilisera un test de Student pour variances inégales. Si la distribution n'est pas normale, on utilisera un test de Wilcoxon. Pour étudier l'évolution longitudinale des variables au cours du suivi, des modèles linéaires mixtes pour données longitudinales seront utilisés. Les conditions d'application du modèle (normalité et homoscedasticité des résidus) seront étudiées. Une transformation de la variable pourra être envisagée si nécessaire.

10.2.4. LOGICIEL UTILISE

Les analyses seront réalisées avec le logiciel SAS[®] (version n°9.4 ou ultérieures).

10.3. PLAN D'ANALYSE

Un plan d'analyse statistique détaillé sera défini et fera l'objet d'une validation par le Conseil Scientifique de l'étude ainsi que toutes modifications ultérieures.

10.3.1. DESCRIPTION DES INCLUSIONS ET DU SUIVI

Sont réalisés :

- un bilan de la base de données indiquant le nombre de fiches saisies dans chaque table de la base ;
- une vérification des critères d'éligibilité ;
- un bilan des visites de suivi réalisées ;
- un bilan des patients inclus, suivis et analysés.

10.3.2. PATIENTS EXCLUS DE L'ANALYSE

Ne pourront être exclus de l'analyse que les patients inclus à tort pour critère(s) majeur(s) d'éligibilité non respecté(s) ou ayant retiré leur consentement.

Cette décision d'exclusion sera prise par le Conseil Scientifique après documentation de l'observation par le Centre de Méthodologie et de Gestion des données, en insu de l'évolution du patient après l'inclusion.

En dehors de ces exclusions, les patients décédés, perdus de vue ou ayant abandonné la recherche, seront tous inclus dans l'analyse.

10.3.3. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS A L'INCLUSION

Les patients seront décrits selon les variables suivantes :

- respect des critères d'éligibilité ;
- caractéristiques cliniques ;
- caractéristiques biologiques ;
- caractéristiques de traitements ;

Une description des violations du protocole et des patients répartis selon ces violations sera faite.

Une description des causes de décès et d'abandon sera faite.

10.3.4. ANALYSE DE L'OBJECTIF PRINCIPAL

La proportion de patients décédés, ainsi que son intervalle de confiance à 95% selon la loi binomiale exacte, seront calculés.

10.3.5. ANALYSE DES OBJECTIFS SECONDAIRES

L'analyse des objectifs secondaires utilisera les méthodes statistiques descriptives détaillées précédemment.

10.4. SURVEILLANCE DE LA RECHERCHE

10.4.1. CONSEIL SCIENTIFIQUE

10.4.1.1. Composition

Il est composé des personnes suivantes : Maxime Poteau (président), Didier Gruson, Chloé Gisbert-Mora, Cédric Carrié, Noémie Sauvage, Renaud Prével, Céline Bairras-Martin, Laura Richert, Tanguy Cariou

10.4.1.2. Rythme des réunions

Le Conseil Scientifique de la recherche se réunit au moment du début de l'étude puis 1 fois par an puis à la fin de l'étude.

10.4.1.3. Rôle

- Il a pour mission de prendre toute décision importante à la demande de l'investigateur coordonnateur concernant la bonne marche de la recherche et le respect du protocole.
- Il vérifie le respect de l'éthique.
- Il s'informe auprès du Centre de Méthodologie et de Gestion des données et du centre investigateur coordonnateur de la recherche de l'état d'avancement de la recherche, des problèmes éventuels et des résultats disponibles.
- Il décide de toute modification pertinente du protocole nécessaire à la poursuite de la recherche, notamment :
 - les mesures permettant de faciliter le recrutement dans la recherche,
 - les modifications des documents de la recherche (protocole et des documents d'information et de recueil de consentement) avant leur présentation au CPP,
 - les décisions d'ouvrir ou de fermer des sites participant à la recherche,
 - les mesures qui assurent aux personnes participant à la recherche la meilleure sécurité,
 - la discussion des résultats et la stratégie de publication de ces résultats.
- Le Conseil Scientifique peut proposer de prolonger ou d'interrompre la recherche en cas de rythme d'inclusion trop lent, d'un trop grand nombre de perdus de vue, de violations majeures du protocole ou bien pour des raisons médicales et/ou administratives. Il précise les modalités éventuelles du suivi prolongé des participants inclus dans la recherche.
- A l'issue de la réunion, le président du Conseil Scientifique doit informer le promoteur des décisions arrêtées. Les décisions concernant une modification majeure ou une modification de budget doivent être approuvées par le promoteur.
-

10.4.2. COMITE INDEPENDANT DE SURVEILLANCE

La recherche s'inscrivant dans le cadre de Recherche Impliquant la Personne Humaine dite « Recherches interventionnelles à risques et contraintes minimales » un Comité Indépendant de Surveillance ne sera pas constitué. En effet, la pipéracilline-tazobactam est un médicament utilisé chez de nombreux patients de réanimation depuis de nombreuses années dont la sécurité d'utilisation dans cette population a été largement démontrée. Elle est ici utilisée dans le cadre de son AMM comme précisé précédemment.

10.4.3. COMITE DE VALIDATION DES EVENEMENTS

Un comité de validation des événements sera constitué de 3 réanimateurs du CHU de Bordeaux indépendants des investigateurs (Drs Antoine Dewitte et Benjamin Repousseau exerçant en anesthésie-réanimation à l'hôpital Haut-Lévêque, Dr Olivier Guisset exerçant en médecine intensive réanimation à l'hôpital Saint-André). Les membres du comité de validation des événements auront accès au dossier médical de façon anonymisée afin de valider le diagnostic de PAVM dont le diagnostic différentiel par rapport aux événements survenant sous ventilation mécanique (comme des bronchites ou trachéo-bronchiques) peut être difficile ainsi que la mortalité attribuable à la PAVM.

11. DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

11.1. ACCES AUX DONNEES

L'acceptation de la participation au protocole implique que les investigateurs mettront à disposition les documents et données individuelles strictement nécessaires au suivi, au contrôle qualité et à l'audit de la recherche, à la disposition

des personnes ayant un accès à ces documents conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

11.2. DONNEES SOURCE

Ensemble des informations figurant dans des documents originaux, ou dans des copies authentifiées de ces documents, relatif aux examens cliniques, aux observations ou à d'autres activités menées dans le cadre d'une recherche et nécessaires à la reconstitution et à l'évaluation de la recherche. Les documents dans lesquels les données sources sont enregistrées sont appelés les documents sources.

Les documents source seront le dossier médical du patient ainsi que les résultats biologiques et microbiologiques.

11.3. CONFIDENTIALITE DES DONNEES

Conformément aux dispositions législatives en vigueur, les personnes ayant un accès direct aux données source prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux recherches, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel.

Pendant la recherche ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au promoteur par les investigateurs (ou tout autre intervenant spécialisé) seront rendues anonymes. Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

Chaque participant se verra attribuer un code confidentiel d'identification, composé du numéro de centre investigateur (1 chiffres) et d'un numéro de participant (2 chiffres) anonyme.

Le promoteur s'assurera que chaque personne qui se prête à la recherche a donné son consentement pour l'accès aux données individuelles la concernant et strictement nécessaires au contrôle de qualité de la recherche.

12. CONTROLE ET ASSURANCE QUALITE

12.1. CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES

Toutes les informations requises par le protocole doivent être consignées sur les cahiers d'observation électronique, et une explication doit être apportée pour chaque donnée manquante. Les données doivent être recueillies au fur et à mesure qu'elles sont obtenues, et transcrites dans ces cahiers de façon nette et lisible.

12.2. CONTROLE QUALITE

Un attaché de recherche clinique mandaté par le promoteur visite de façon régulière chaque centre investigateur, lors de la mise en place de la recherche, une ou plusieurs fois en cours de recherche selon le rythme des inclusions et en fin de recherche. Lors de ces visites, et conformément au plan de monitoring, les éléments suivants seront revus :

- consentement éclairé,
- respect du protocole de la recherche et des procédures qui y sont définies,
- qualité des données recueillies dans le cahier d'observation : complétude, exactitude, données manquantes, cohérence des données avec les documents source (dossiers médicaux, carnets de rendez-vous, originaux des résultats de laboratoire, etc,...),
- gestion des produits éventuels.

Toute visite fera l'objet d'un rapport de monitoring par compte-rendu écrit.

12.3. GESTION DES DONNEES

12.3.1. LOGICIEL DE GESTION DE DONNEES

12.3.1.1. Logiciel utilisé

Le logiciel utilisé pour la gestion des données est REDCap. Il est couplé avec une base de données MySQL dédiée.

12.3.1.2. Hébergement des données

La Direction des Systèmes d'Information (DSI) du CHU de Bordeaux assure l'hébergement et la maintenance de la base de données conformément à ses procédures. Les serveurs (Internet et de base de données) sont hébergés dans l'enceinte de la DSI du CHU de Bordeaux (Talence, Gironde).

12.3.1.3. Sécurité des données

La gestion des droits d'accès au logiciel est sous la responsabilité de l'administrateur REDCap du CHU de Bordeaux.

12.3.2. CREATION DU CAHIER D'OBSERVATION

Les masques de saisie de l'eCRF se basent sur une version WORD du cahier d'observation, qui est rédigé par l'ARC coordonnateur. La validation finale du document est faite par le data manager. Un circuit de relecture défini dans le modèle de cahier permet de valider le cahier d'observation. Une fois le cahier validé, le data manager crée les masques de saisie internet. L'eCRF est développé via le logiciel REDCap par le data manager de l'étude.

12.3.3. SAISIE DES DONNEES

La saisie des données dans l'eCRF est sous la responsabilité de l'investigateur du centre. Toute autre personne que l'investigateur effectuant la saisie dans l'eCRF doit être préalablement formée et déléguée par l'investigateur pour le faire.

12.3.4. DROIT D'ACCES

Seuls les data managers, l'équipe projet du CMG (USMR, CHU de Bordeaux) et les auditeurs ont des droits d'accès direct à la base de données.

12.3.5. ROLES

L'équipe investigatrice est responsable des modifications sur les données. Aucun membre de l'équipe projet du CMG ne peut se substituer à elle pour la réalisation des corrections de données. Elle est également en charge du codage des événements indésirables et des traitements, sous responsabilité de l'investigateur. Le data manager est responsable de la gestion des demandes de correction, qu'il doit faire régulièrement.

12.3.6. CODAGE DES DONNEES

Les traitements prescrits et les événements cliniques sont codés dans l'eCRF afin de pouvoir effectuer le contrôle et l'analyse des données.

Les dictionnaires suivants sont utilisés pour le codage des termes médicaux :

- MedDRA (version en cours, LLT) FR/US
- ATC

12.3.7. CONTROLES DES DONNEES

Des contrôles sont programmés afin de vérifier la cohérence et la complétude des données saisies dans l'eCRF. La liste des contrôles à mettre en place est définie conjointement entre l'investigateur coordonnateur et le CMG, dans le plan de validation des données de l'étude.

Les demandes de corrections sont gérées par le data manager. Elles sont envoyées au centre investigateur via l'eCRF. L'équipe investigatrice fait les corrections nécessaires à la résolution des demandes de corrections.

12.3.8. RECONCILIATION DES BASES EI/EIG

Si nécessaire, le croisement des bases est effectué par l'Unité de Sécurité et de Vigilance (USV) du CHU de Bordeaux selon la procédure en vigueur. Les réconciliations sont effectuées régulièrement selon un rythme défini par le Comité Indépendant de Surveillance. Le Data Manager est responsable de la transmission de la table des événements indésirables à l'USV. Les données sont exportées sous forme de fichier Excel qui est déposé sur la plateforme d'échanges sécurisés CIRBUS.

12.3.9. GEL DE LA BASE DE DONNEES

La base de données sera gelée pour l'analyse finale. Le gel des données est réalisé conformément à la procédure en vigueur au CMG.

12.3.10. TRANSFERT DES DONNEES

Si nécessaire, le transfert de données peut être envisagé. Les transferts de données (envoi, réception) sont réalisés conformément à la procédure en vigueur au CMG et selon les formats souhaités en fonction des contraintes existantes. Pour des raisons de sécurité, les fichiers de données sont anonymisés puis transférés via la plateforme sécurisée CIRBUS.

12.3.11. ARCHIVAGE DE LA BASE DE DONNEES

L'archivage de la base de données est sous la responsabilité du promoteur de l'étude. Les données de l'étude restent stockées dans le serveur de la DSI du CHU de Bordeaux, conformément à la réglementation en vigueur pour l'étude. Une copie physique est conservée par le promoteur conformément à la réglementation en vigueur.

12.3.12. MANAGEMENT DE LA QUALITE

Les activités de l'équipe projet du CMG sont intégrées au système de management de la qualité du CMG. La gestion des non-conformités est assurée conformément à la procédure en vigueur au CMG.

12.4. AUDIT ET INSPECTION

Sous réserve d'une information dans un délai de convenance, un audit peut être réalisé à tout moment par des personnes mandatées par le promoteur et indépendantes des personnes menant la recherche. Il a pour objectif de vérifier la sécurité des participants et le respect de leurs droits, le respect de la réglementation applicable et la fiabilité des données.

Une inspection pourrait également être diligentée par une autorité compétente..

L'audit, aussi bien que l'inspection, pourront s'appliquer à tous les stades de la recherche, du développement du protocole à la publication des résultats et au classement des données utilisées ou produites dans le cadre de la recherche.

Les investigateurs acceptent de se conformer aux exigences du promoteur en ce qui concerne un audit et à l'autorité compétente pour une inspection de la recherche.

13. CONSIDERATIONS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES

Le promoteur et l'(es) investigateur(s) s'engagent à ce que cette recherche soit réalisée en conformité avec la loi n°2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine, ainsi qu'en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques (I.C.H. version 4 du 9 novembre 2016 et décision du 24 novembre 2006) et la déclaration d'Helsinki (qui peut être retrouvée dans sa version intégrale sur le site <http://www.wma.net>).

La recherche est conduite conformément au présent protocole. Hormis dans les situations d'urgence nécessitant la mise en place d'actes thérapeutiques précis, l'(es) investigateur(s) s'engage(nt) à respecter le protocole en tous points en particulier en ce qui concerne le recueil du consentement et la notification et le suivi des événements indésirables graves.

Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) de **nom du CPP** et a fait l'objet d'une information auprès de l'ANSM.

Le CHU de Bordeaux, promoteur de cette recherche, a souscrit un contrat d'assurance en responsabilité civile auprès de HDI Global SE conformément aux dispositions du code de la santé publique.

Les données enregistrées à l'occasion de cette recherche font l'objet d'un traitement informatisé à l'*USMR* dans le respect de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés modifiée par la loi 2004-801 du 6 août 2004.

Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de référence » (MR-001) en application des dispositions de l'article 54 alinéa 5 de la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'information, aux fichiers et aux libertés. Ce changement a été homologué par décision du 5 janvier 2006, mise à jour le 21 juillet 2016. Le CHU de Bordeaux a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de référence ».

Cette recherche est enregistrée dans la base ID-RCB sous le n° **numéro enregistrement**.

Cette recherche est enregistrée sur le site <http://clinicaltrials.gov/>

Après la recherche, la conservation de la collection d'échantillons biologiques sera déclarée au ministre chargé de la recherche et au directeur de l'Agence Régionale de Santé (et soumise au CPP pour avis si changement de finalité de recherche).

MODIFICATIONS AU PROTOCOLE

Toute modification substantielle, c'est à dire toute modification de nature à avoir un impact significatif sur la protection des personnes, sur les conditions de validité et sur les résultats de la recherche, sur la qualité et la sécurité des produits expérimentés, sur l'interprétation des documents scientifiques qui viennent appuyer le déroulement de la recherche ou sur les modalités de conduite de celle-ci, fait l'objet d'un amendement écrit qui est soumis au promoteur ; celui-ci doit obtenir, préalablement à sa mise en œuvre, un avis favorable/autorisation des autorités concernées (CPP, CNIL, ...).

Les modifications non substantielles, c'est à dire celles n'ayant pas d'impact significatif sur quelque aspect de la recherche que ce soit, sont communiquées au CPP à titre d'information.

Toutes les modifications sont validées par le promoteur, et par tous les intervenants de la recherche concernés, avant soumission au CPP. Cette validation peut nécessiter la réunion du CS et/ou du CIS.

Toutes les modifications au protocole doivent être portées à la connaissance de tous les investigateurs qui participent à la recherche. Les investigateurs s'engagent à en respecter le contenu.

Toute modification qui modifie la prise en charge des participants ou les bénéficiaires, risques et contraintes de la recherche fait l'objet d'une nouvelle note d'information et d'un nouveau formulaire de consentement dont le recueil suit la même procédure que celle précitée.

14. CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

Les documents suivants relatifs à cette recherche sont archivés conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques et à la réglementation en vigueur :

- Le protocole et les modifications éventuelles au protocole
- Les cahiers d'observation (copies)
- Les dossiers source des participants ayant donné un consentement
- Tous les autres documents et courriers relatifs à la recherche
- L'exemplaire original des consentements éclairés signés des participants

Tous ces documents sont sous la responsabilité de l'investigateur pendant la durée réglementaire d'archivage.

Aucun déplacement ou destruction ne pourra être effectué sans l'accord du promoteur. Au terme de la durée réglementaire d'archivage, le promoteur sera consulté pour destruction. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audit ou d'inspection.

15. RAPPORT FINAL

Dans un délai d'un an suivant la fin de la recherche ou son interruption, un rapport final sera établi et signé par le promoteur et l'investigateur. Ce rapport sera tenu à la disposition de l'autorité compétente. Le promoteur transmettra à l'ANSM et au CPP les résultats de la recherche sous forme d'un résumé du rapport final dans un délai d'un an après la fin de la recherche.

16. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

16.1. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

L'analyse des données fournies par les centres investigateurs est réalisée par l'Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche Clinique et Epidémiologique du CHU de Bordeaux (USMR). Cette analyse donne lieu à un rapport écrit qui est soumis au promoteur, qui transmettra au Comité de Protection des Personnes et à l'autorité compétente.

Toute communication écrite ou orale des résultats de la recherche doit recevoir l'accord préalable de l'investigateur coordonnateur et, le cas échéant, de tout comité constitué pour la recherche.

L'investigateur coordonnateur/principal s'engage à mettre à disposition du public les résultats de la recherche aussi bien négatifs et non concluants que positifs.

La publication des résultats principaux mentionne le nom du promoteur, de tous les investigateurs ayant inclus ou suivi des participants dans la recherche, des méthodologistes, biostatisticiens et data managers ayant participé à la recherche, des membres du(des) comité(s) constitué(s) pour la recherche. Il sera tenu compte des règles internationales d'écriture et de publication (The Uniform Requirements for Manuscripts de l'ICMJE, avril 2010).

16.2. COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PARTICIPANTS

Conformément à la loi n°2002-303 du 4 mars 2002, les participants sont informés, à leur demande, des résultats globaux de la recherche.

16.3. CESSION DES DONNEES

La gestion des données est assurée par l'Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche Clinique et Epidémiologique du CHU de Bordeaux (USMR). Les conditions de cession de tout ou partie de la base de données de la recherche sont décidées par le promoteur de la recherche et font l'objet d'un contrat écrit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018 Nov [cited 2018 Nov 14]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918306054>
2. Hoffman SJ, Outterson K, Røttingen J-A, Cars O, Clift C, Rizvi Z, et al. An international legal framework to address antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ*. 2015 Feb 1;93(2):66–66.
3. Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Mar;11(3):321–31.
4. Timsit J-F, Pilmis B, Zahar J-R. How Should We Treat Hospital-Acquired and Ventilator-Associated Pneumonia Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae? *Semin Respir Crit Care Med*. 2017 Jun;38(03):287–300.
5. Barbier F, Pommier C, Essaïed W, Garrouste-Orgeas M, Schwebel C, Ruckly S, et al. Colonization and infection with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in ICU patients: what impact on outcomes and carbapenem exposure? *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr;71(4):1088–97.
6. Armand-Lefevre L, Angebault C, Barbier F, Hamelet E, Defrance G, Ruppe E, et al. Emergence of Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli in Intestinal Flora of Intensive Care Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Mar 1;57(3):1488–95.
7. McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, Qi C, Bolon M, Scheetz MH. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct;57(10):5131–3.
8. Boucher A, Meybeck A, Patoz P, Valette M, Thellier D, Delannoy PY, et al. Alternatives to carbapenems in ventilator-associated pneumonia due to ESBL-producing Enterobacteriaceae. *J Infect*. 2016;73(3):293–6.
9. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, Mo Y, Lee TH, Yilmaz M, et al. Effect of Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for Patients With E coli or Klebsiella pneumoniae Bloodstream Infection and Ceftriaxone Resistance: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2018 11;320(10):984–94.
10. Prevel R, Berdaï D, Boyer A. Antibiotics for Ceftriaxone-Resistant Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections. *JAMA*. 2019 12;321(6):613.
11. Sfeir MM. Post- MERINO trial: Any role for piperacillin-tazobactam in treating bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2019 Mar [cited 2019 Mar 22]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857919300603>
12. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Kahlmeter G. Antibiotics for Ceftriaxone-Resistant Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections. *JAMA*. 2019 Feb 12;321(6):612.
13. Lepape A, Machut A, Savey A. Réseau national Réa-Raisin de surveillance des infections acquises en réanimation adulte - Méthodes et principaux résultats. *Médecine Intensive Réanimation*. 2018 May 1;27(3):197–203.
14. Razazi K, Derde LPG, Verachten M, Legrand P, Lesprit P, Brun-Buisson C. Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit. *Intensive Care Med*. 2012 Nov;38(11):1769–78.
15. for the OUTCOMEREA Study Group, Barbier F, Bailly S, Schwebel C, Papazian L, Azoulay É, et al. Infection-related ventilator-associated complications in ICU patients colonised with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Intensive Care Med*. 2018 May;44(5):616–26.

16. Martins IS, Pessoa-Silva CL, Nouer SA, Pessoa de Araujo EG, Ferreira ALP, Riley LW, et al. Endemic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* at an intensive care unit: risk factors for colonization and infection. *Microb Drug Resist* Larchmt N. 2006;12(1):50–8.
17. Razazi K, Mekontso Dessap A, Carteaux G, Jansen C, Decousser J-W, de Prost N, et al. Frequency, associated factors and outcome of multi-drug-resistant intensive care unit-acquired pneumonia among patients colonized with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 Oct 31];7(1). Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0283-4>
18. Carbonne H, Le Dorze M, Bourrel A-S, Poupet H, Poyart C, Cambau E, et al. Relation between presence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in systematic rectal swabs and respiratory tract specimens in ICU patients. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2017 Dec [cited 2017 Oct 6];7(1). Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0237-x>
19. Bruyère R, Vigneron C, Bador J, Aho S, Toitot A, Quenot J-P, et al. Significance of Prior Digestive Colonization With Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Enterobacteriaceae in Patients With Ventilator-Associated Pneumonia: *Crit Care Med*. 2015 Nov;1.
20. Houard M, Rouzé A, Ledoux G, Six S, Jaillette E, Poissy J, et al. Relationship between digestive tract colonization and subsequent ventilator-associated pneumonia related to ESBL-producing Enterobacteriaceae. Kou YR, editor. *PLOS ONE*. 2018 Aug 8;13(8):e0201688.
21. Falcone M, Vena A, Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Goldoni P, et al. Role of empirical and targeted therapy in hospitalized patients with bloodstream infections caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae. *Ann Ig Med Prev E Comunita*. 2014 Aug;26(4):293–304.
22. Joo E-J, Park DA, Lee NR, Moon S-Y, Choi J-K, Ko J-H, et al. Impact of appropriateness of empiric therapy on outcomes in community-onset bacteremia by extended-spectrum- β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* definitively treated with carbapenems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2017 Nov;36(11):2093–100.
23. Vogelaers D, De Bels D, Forêt F, Cran S, Gilbert E, Schoonheydt K, et al. Patterns of antimicrobial therapy in severe nosocomial infections: empiric choices, proportion of appropriate therapy, and adaptation rates--a multicentre, observational survey in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):375–81.
24. Scheuerman O, Schechner V, Carmeli Y, Gutiérrez-Gutiérrez B, Calbo E, Almirante B, et al. Comparison of Predictors and Mortality Between Bloodstream Infections Caused by ESBL-Producing *Escherichia coli* and ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39(6):660–7.
25. Jalalzai W, Boutrot M, Guinard J, Guigon A, Bret L, Poisson D-M, et al. Cessation of screening for intestinal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a low-endemicity intensive care unit with universal contact precautions. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Apr;24(4):429.e7-429.e12.
26. Roberts JA, Abdul-Aziz M-H, Davis JS, Dulhunty JM, Cotta MO, Myburgh J, et al. Continuous versus Intermittent β -Lactam Infusion in Severe Sepsis. A Meta-analysis of Individual Patient Data from Randomized Trials. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Sep 15;194(6):681–91.
27. Roberts JA, Kirkpatrick CMJ, Roberts MS, Dalley AJ, Lipman J. First-dose and steady-state population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin by continuous or intermittent dosing in critically ill patients with sepsis. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Feb 1;35(2):156–63.
28. Boselli E, Breilh D, Rimmelé T, Guillaume C, Xuereb F, Saux M-C, et al. Alveolar concentrations of piperacillin/tazobactam administered in continuous infusion to patients with ventilator-associated pneumonia*. *Crit Care Med*. 2008 May 1;36(5):1500–6.
29. Carrié C, Legeron R, Petit L, Ollivier J, Cottenceau V, d'Houdain N, et al. Higher than standard dosing regimen are needed to achieve optimal antibiotic exposure in critically ill patients with augmented renal clearance receiving piperacillin-tazobactam administered by continuous infusion. *J Crit Care*. 2018 Dec;48:66–71.

30. Besnard T, Carrié C, Petit L, Biais M. Increased dosing regimens of piperacillin-tazobactam are needed to avoid subtherapeutic exposure in critically ill patients with augmented renal clearance. *Crit Care Lond Engl*. 2019 Jan 16;23(1):13.
31. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauger S, Gibot S, et al. Pneumonies associées aux soins de réanimation. *Anesth Réanimation*. 2018 Sep;4(5):421–41.
32. Ben-Chetrit E, El Dahim MA, Bar-Meir M, Dodin M, Katz DE. Associated factors and clinical outcomes of bloodstream infection due to extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during febrile neutropenia. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2018 Dec [cited 2018 Dec 17]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857918303650>
33. Shenoy ES, Macy E, Rowe T, Blumenthal KG. Evaluation and Management of Penicillin Allergy: A Review. *JAMA*. 2019 Jan 15;321(2):188–99.
34. Rubin R. Overdiagnosis of Penicillin Allergy Leads to Costly, Inappropriate Treatment. *JAMA*. 2018 Nov 13;320(18):1846–8.
35. Trubiano JA, Adkinson NF, Phillips EJ. Penicillin Allergy Is Not Necessarily Forever. *JAMA*. 2017 Jul 4;318(1):82–3.
36. Blumenthal KG, Peter JG, Trubiano JA, Phillips EJ. Antibiotic allergy. *The Lancet*. 2019 Jan;393(10167):183–98.
37. Salkind AR, Cuddy PG, Foxworth JW. The rational clinical examination. Is this patient allergic to penicillin? An evidence-based analysis of the likelihood of penicillin allergy. *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2498–505.
38. Zahar JR, Garrouste-Orgeas M, Vesin A, Schwebel C, Bonadona A, Philippart F, et al. Impact of contact isolation for multidrug-resistant organisms on the occurrence of medical errors and adverse events. *Intensive Care Med*. 2013 Dec;39(12):2153–60.
39. Morgan DJ, Diekema DJ, Sepkowitz K, Perencevich EN. Adverse outcomes associated with Contact Precautions: a review of the literature. *Am J Infect Control*. 2009 Mar;37(2):85–93.
40. Prevel R, Boyer A, M'Zali F, Cockenpot T, Lasheras A, Dubois V, et al. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacterales faecal carriage in a medical intensive care unit: low rates of cross-transmission and infection. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:112.
41. Dickstein Y, Leibovici L, Yahav D, Eliakim-Raz N, Daikos GL, Skiada A, et al. Multicentre open-label randomised controlled trial to compare colistin alone with colistin plus meropenem for the treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative infections (AIDA): a study protocol. *BMJ Open*. 2016 Apr 20;6(4):e009956.
42. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et al. Summary of the international clinical guidelines for the management of hospital-acquired and ventilator-acquired pneumonia. *ERJ Open Res*. 2018 Apr;4(2).
43. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
44. Boyer A, Medrano J, Mzali F, Balick-Weber C-C, Bessède E, Picard W, et al. Direct testing of bronchoalveolar lavages from ventilator-associated pneumonia patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Jun;73(2):107–10.
45. Boyer A, Goret J, Clouzeau B, Romen A, Prevel R, Lhomme E, et al. Tailoring Empirical Antimicrobial Therapy in Subjects With Ventilator-Associated Pneumonia With a 10-Hour E-Test Approach. *Respir Care*. 2019 Mar;64(3):307–12.
46. Boyer A, Amadeo B, Vargas F, Yu M, Maurice-Tison S, Dubois V, et al. Severe community-acquired Enterobacter pneumonia: a plea for greater awareness of the concept of health-care-associated pneumonia. *BMC Infect Dis*. 2011;11:120.

47. Boyer A, Couallier V, Clouzeau B, Lasheras A, M'zali F, Kann M, et al. Control of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae nosocomial acquisition in an intensive care unit: A time series regression analysis. *Am J Infect Control*. 2015 Dec;43(12):1296–301.
48. Prevel R, Boyer A, M'Zali F, Lasheras A, Zahar J-R, Rogues A-M, et al. Is systematic fecal carriage screening of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae still useful in intensive care unit: a systematic review. *Crit Care Lond Engl*. 2019 May 14;23(1):170.
49. Carrié C, Rubin S, Sioniac P, Breilh D, Biais M. The kinetic glomerular filtration rate is not interchangeable with measured creatinine clearance for prediction of piperacillin underexposure in critically ill patients with augmented renal clearance. *Crit Care Lond Engl*. 2018 23;22(1):177.
50. Boselli E, Breilh D, Djabarouti S, Guillaume C, Rimmelé T, Gordien J-B, et al. Reliability of mini-bronchoalveolar lavage for the measurement of epithelial lining fluid concentrations of tobramycin in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2007 Sep;33(9):1519–23.
51. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr 1;18(4):391–400.